

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-261761

(43)Date of publication of application : 20.09.1994

(51)Int.Cl. C12N 15/12
 C12N 5/10
 C12P 21/02
 C12Q 1/02
 //(C12P 21/02
 C12R 1:91)

(21)Application number : 06-011572

(71)Applicant : ELI LILLY & CO

(22)Date of filing : 03.02.1994

(72)Inventor : DANTZIG ANNE H
 HOSKINS JOANN
 SKATRUD PAUL LUTHER

(30)Priority

Priority number : 93 13462 Priority date : 04.02.1993 Priority country : US

(54) MAMMALIAN INFLUX PEPTIDE TRANSPORTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new DNA useful for expression of mammalian influx peptide transporter activities for measuring oral bioavailability of a medicine.

CONSTITUTION: This DNA compound is an isolated one containing a DNA sequence encoding human influx peptide transporter activities, and, for example, containing the DNA sequence encoding a protein having an amino acid sequence of the formula. The DNA can be obtained by a solution or solid synthesis.

Met Cys Ser His Ala Ile Ser His Leu Ser Ser Ser Ser Ser
 1 12 13 14
 Tyr Ileu Ala Ser Cys Arg Cys Cys Cys Arg His Ser Cys Pro
 20 21 22 23 24
 Leu Val Arg Met Thr His Ser Ile Cys Cys Cys Cys Cys Pro Ser
 30 31 32 33 34 35
 Glu Ala Val Phe Cys Phe Val Asp Ser Pro Ala Val Thr Phe
 40 41 42 43 44 45
 Cys Ser Thr Cys Cys Thr Asp Ser Thr His Val Ile Cys Arg Cys
 50 51 52 53 54 55
 Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 60 61 62 63 64 65

Glu Cys Ser Ala Tyr Val Val Leu Cys Arg Thr Ser Arg Cys Cys
 70 71 72 73 74 75 76
 Arg Arg Pro Ser Glu Cys Ile Val Ser Ser Ser Ser Thr Thr Phe Cys
 80 81 82 83 84 85 86
 Ser Cys Tyr Glu Cys Ser Cys Thr Arg Pro Ala Cys His Ser Ser
 90 91 92 93 94 95 96
 Cys Ile Pro Thr Glu Cys Ser Ala Val Cys Ile Leu Ser Thr Thr
 100 101 102 103 104 105 106
 Ser Ser Val His Asp His Ile Ser Ala Val Val Phe His Arg Thr
 110 111 112 113 114 115 116 117
 Cys Ser Asp Ser Cys Thr Arg Arg Val Cys Ser Ala Glu Ser Ser
 120 121 122 123 124 125 126 127
 Glu Val Cys Pro Ser Arg Ser
 130 131

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C), 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The isolated DNA compound including the DNA array which is carrying out the code of the Homo sapiens inflow peptide transporter activity.

[Claim 2] The isolated DNA compound including the DNA array which is carrying out the code of the protein which has the amino-acid-residue array of the array number 1 according to claim 1.

[Claim 3] The isolated DNA compound including the DNA array of the array number 2 according to claim 2.

[Claim 4] A recombinant DNA vector including a DNA array according to claim 1, 2, or 3.

[Claim 5] The host cell by which the transformation was carried out by the recombinant DNA vector according to claim 4.

[Claim 6] The DNA array which is carrying out the code of the Homo-sapiens inflow peptide transporter activity which installed so that it might be discovered from promotor and translation activation array; which performs the transformation of a host cell using the recombinant DNA expression vector containing (a) below approach: (1) which consists of a process of the following which makes Homo-sapiens inflow peptide transporter activity discover, and (b), and functions in a : (a) this host cell, (b) this promotor, and a translation activation array;

(2) Cultivate this host cell by which the transformation was carried out in the process (1) under the suitable conditions for the manifestation of Homo sapiens inflow peptide transporter activity.

[Claim 7] The approach according to claim 6 by which the transformation of the host cell is carried out by the recombinant DNA expression vector according to claim 4.

[Claim 8] How to consist of the following processes for measuring intracellular incorporation of a compound: By the recombinant DNA expression vector which brings about the manifestation of (a) Homo sapiens inflow peptide transporter activity, contact the cell and this compound by which the transformation was carried out, and carry out assay about; and transportation of this compound to the inside of (b) this cell.

[Claim 9] The approach according to claim 8 by which the transformation of the cell is carried out by the recombinant DNA expression vector according to claim 4.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]
[0001]

[Industrial Application] this invention — a recombination deoxyribonucleic acid (following "DNA") — it is related with the field of law. This invention offers the isolated DNA compound containing DNA which is carrying out the code of the inflow peptide transporter (following "inflow peptide transporter") activity of a proton-dependency. Furthermore, a recombinant DNA vector and a host cell are offered.

[0002]

[Description of the Prior Art] In a mammals cell, a peptide is conveyed out of intracellular and a cell by the transporter from which some differ. The transporter which bears functionally an outflow out of the transporter which bears the intracellular inflow of a peptide, and the cell of a peptide exists. An inflow transporter conveys a small peptide and the compound of relation into cytoplasm, and they are carrying out indirect linking to the energy source through ion inclination. An outflow transporter consists of a transporter from which some which function as removing a peptide from cytoplasm differ. [Endicott and Ling by which P-glycoprotein which removes many oncolysis objects and hydrophobic peptides is contained in these, 1989, Annu.Rev.Biochem.58:137-171; Sharma and others, 1992, J.Biol.Chem.267 : 5731-5734].

[0003] This invention relates to the peptide transporter which bears the inflow of the peptide to a cell or organelle. The peptide transporter of this class A gastrointestinal tract, the kidney, [Ganapathy and others located in a placenta and liver lysosome, 1991, and Indian J.Biochem.Biophys.28 Am.J.Physiol. : 317-323; — Skopicki and others and 1991 — 261 : F670-F678; Ganaopathy and others, 1981, J.Biol.Chem.256 : 118-124; Bird and Lloyd, 1990, Biochim.Biophys.Acta 1024 : 267-270].

[0004] Usually, an inflow peptide transporter is located in the brush border of the epithelial cell of membrane. The property of a transporter is studied among an intestinal-mucosa preparation object in the location of a basis, and is further studied by in vitro one using the brush-border-membrane vesicle, the isolated intestines cell, and the cell culture object. A rat, a hamster, a rabbit, a fowl, The preparation object obtained from a Japanese newt and Homo sapiens [Ganapathy and Leibach to which it uses for and research is done, 1991, Curr.Biol.3 : 695-701; Said and others, 1988, Biochim.Biophys.Acta 941 : 232-240; Kramer and others and 1988, Biochim.Biophys.Acta 939 : 167-172; Colonge and others, 1990 and Am.J.Physiol. 259 : G775-G780; Shimada and Hoshi, 1986, Jpn.J.Physiol.36 : 451-465; Matthews and Burston, 1984, and Clinical Sci., 67 : 541-549]. A small peptide (JI and tripeptide), an antibiotic (some oral beta-lactams are included), Oral angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, The solute from which many containing oral renin inhibitor differ and by the inflow peptide transporter [Ganapathy and Leibach which are conveyed into the cytoplasm of an intestines cell, 1991, and Curr.Biol.3 : — 695-701; Okano and others, 1986, and J.Biol.Chem.261 : 14130-14134; Nakashima and others, 1984, Biochem.Pharm.33:3345-3352; Muranushi and others, 1989, Pharm.Res.6 : 308-312; Friedman and Amidon, 1989 and Pharm.Res.6 : 1043-1047; Friedman and Amidon, 1990, J.Control.Rel.13 : 141-146; Kramer, 1991, and 17 th International Congress of Chemotherapy, June 23-28, Berlin, F.R.G., Abstract No.1415].

[0005] An inflow peptide transporter plays a central role in absorption of the oral medicine object

containing beta-lactam and ACE inhibitor of a certain kind. The inflow peptide transporter was able to distinguish what is absorbed in taking orally in *Homo sapiens*, and a thing without that right among 27 sorts of investigated beta-lactam antibiotics [Tabas and others, 1991, and 31 st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract No.164]. Furthermore, the thing for which a parenteral beta-lactam antibiotic is not conveyed although an inflow peptide transporter conveys many oral beta-lactam antibiotics In the research using *Homo sapiens* intestines Caco-2 cell and the rabbit intestines brush film [Dantzig and others shown and 1992, *Biochim.Biophys.Acta* 1112 : 167-173; Dantzig and others, 1992 and 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA, and Abstract No.1460; Snyder and others and 1992, 32 nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract No.1461; Okano and others, 1986, *J.Biol.Chem.*261:14130-14134]. Same research which predicts oral absorption of which ACE inhibitor the capacity of an inflow peptide transporter is investigated and is carried out is done [Friedman and Amidon, 1989, and *Pharm.Res.*6:1043-1047].

[0006] Inflow peptide transporters are a sodium dependency and energy dependence. Symport of the proton is carried out with a substrate ("proton-dependency"). A substrate [Hoshi which presents the capacity condensed to intracellular to level higher than the level which exists out of a cell, 1986, Ion Gradient-Coupled Transport, and INSERM symposium No.26. Editors: F.Alvarado and C.H.van Os, Elsevier Science Publishers; Ganapathy and Leibach, 1991, and *Curr.Opinion Cell Biol.*3:695-701; Ganapathy and others, 1991, *Indian J.Biochem.Biophys.*28 : 317-323]. The substrate specificity of an inflow peptide transporter is investigated in some kinds. Although these are not the same As very similar [Inui and others who comes out and exists, 1992, and *J.Pharmacol.Exp.Thera.*260 :482-486; Ganapathy and Leibach, 1983, and *J.Biol.Chem.*258 : 14189-14192; Yasumoto and Sugiyama, 1980 and *Agric.Biol.Chem.* 44 : 1339-1344; Nakashima and others, 1984, *Biochem.Pharmacol.*33 : 3345-3352; Okano and others, 1986, *Biochem.Pharmacol.*35 : 1781-1786]. The binding site of an inflow peptide transporter is not known, therefore its description of the absolute chemical structure required for association and transportation of a solute is also strange. research of correlation of the structure of a substrate and inhibitor and activity is done, and it is unnecessary to transportation — [as which the structural description of shoes is solved — Bai and others, 1991, and *Pharm.Res.*8 : — 593-599; Snyder and others, 1992, 32 nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Oct.11-14, Anaheim, CA, and Abstract No.1461].

[0007] Inflow peptide transporter activity is [Kramer identified as 127,000dalton membrane protein from rabbit intestinal mucosa by the optical affinity-labeling method using the penicillin or the cefalexin analog by which the radiation label was carried out by which the radiation label was carried out, 1987, and *Biochim.Biophys.Acta* 905:65-74.; Kramer and others, 1988, *Biochem.PHarmacol.*37 : 247-2435]. [which the 127,000dalton protein of purification of the rabbit intestinal-mucosa preparation object origin reconfigured in liposome gave association and transportation activity — Kramer and others, 1990, and *Biochim.Biophys.Acta* 1030 : — 50-59]. [by which the rabbit inflow peptide transporter is functionally discovered in *Xenopus laevis* oocyte — Miyamoto and others, 1991, and *J.Biol.Chem.*266 : — 4742-4745]. However, the structure of the cloning gene which is carrying out the code of the mammalian inflow peptide transporter, or one of its components are not reported to any kinds.

[0008] Probably, cloning of an inflow peptide transporter will be useful for development of the approach of enabling the quick identification and the development of an oral absorption drug which use this device. An oral bioavailability is the very desirable property of many drugs. Probably, especially measurement of the oral bioavailability of the drug in the phase in early stages of development will be advantageous. Current and a drug are first evaluated about an oral bioavailability in the animal model. This process needs selection of a small number of compound very much, and composition of this compound must be expanded to extent evaluated in these models. When a compound is not absorbed in taking orally using these models, in order to attain an oral bioavailability, the analog of the compound is created in many cases. This process wastes time amount, is difficult and requires costs. Furthermore, although you may set to the animal model and it is absorbed, there are many examples of the compound which is not absorbed by *Homo sapiens*. Since it supplements with this conventional approach, other evaluation approaches are needed.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Especially this invention offers the host cell by which the transformation was carried out by the isolated DNA compound including the DNA array which is carrying out the code of the mammalian inflow peptide transporter activity, the recombinant DNA expression vectors which are carrying out the code of the mammalian inflow peptide transporter activity, and these recombinant DNA expression vectors. These recombinant DNA expression vectors and host cells are useful in the approach for making inflow peptide transporter activity discover. (a) below : (1) which this approach becomes from the following processes And (b) So that it may be discovered from promotor and translation activation array; which performs the transformation of a host cell using the included recombinant DNA expression vector, and functions in a : (a) this host cell, (b) this promotor, and a translation activation array DNA array which is carrying out the code of the inflow peptide transporter activity of the installed mammals;

(2) Cultivate this host cell by which the transformation was carried out in the process (1) under the suitable conditions for the manifestation of inflow peptide transporter activity.

[0010] Probably, the capacity which predicts the taking-orally-availability of the drug in Homo sapiens by the initial stage of a drug discovery process will be advantageous. For this purpose, this invention offers a useful analysis means in the prediction of the oral availability of the physic compound in Homo sapiens by the inflow peptide transporter. That is, by the recombinant DNA expression vector which brings about the manifestation of : (a) mammals inflow peptide transporter activity about the approach for measuring incorporation of the compound by the cell which consists of the following processes, one mode of this invention contacts the cell and this compound by which the transformation was carried out, and carries out assay about; and transportation of this compound to the inside of (b) this cell.

[0011] Other modes as these modes of this invention and a hybridization probe of the DNA array of this invention, such as use, are explained in more detail below, and are indicated to a claim.

[0012]

[Means for Solving the Problem]

Definition coding array: The DNA array in the reading frame of the gene which carries out the code of the amino-acid-residue array of the protein discovered from a gene.

DHFR: Dihydrofolate reductase gene.

Gene: The DNA segment containing the promotor who installed so that a gene product might be made to discover, a translation activation array, a coding array, and 3' regulatory sequence.

Inflow peptide transporter activity: Migration of the substrate which crosses the film depending on existence of the proton gradient of internal directivity. Functionally, activity can be measured by measuring transportation of the compound which crosses the film under the absence of the excessive amount of the known substrate (for example, [a small peptide (for example, JI and tripeptide), an antibiotic (for example, cefalexin), oral angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, and oral renin inhibitor]) of a transporter, or existence under existence of pH-inclination (that is, external one has acidity higher than the interior of a cell or a membrane vesicle) of internal directivity.

Promotor: The DNA array which makes the imprint of DNA order or start.

Recombinant-DNA expression vector: It is all the DNA matter that reproduces autonomously or performs a nest, although a plasmid is included, it is not limited to it, but the promotor and other regulatory sequences which were installed so that the DNA segment which carries out the code of a polypeptide or the RNA might be made to discover are included.

Recombinant-DNA array: It is all the DNA arrays that excepted the host chromosome which drew DNA, and include the DNA array by which isolation and composition or partial composition was carried out.

restriction fragment: — all the lines produced according to an operation of the restriction enzyme beyond 1 or it — a DNA molecule.

Translation activation array: The accommodation DNA array which promotes a translation in the protein of mRNA when it imprints to mRNA.

all the nucleotides and amino acid abbreviation which were used by this detail letter — an United States patent trademark station — 37 C.F.R. Section — as shown in 1.822 (b) and (1992), it accepts.

[0013] The restriction enzyme and functional map which were shown in the explanatory view side of a drawing are the near display of the recombinant DNA vector indicated in this specification. The

information on a limit part is not comprehensive. The restriction enzyme part of many predetermined molds may exist from the actually shown part on a map. Drawing 1 is the restriction enzyme part and functional map of a plasmid pPSJ179. Drawing 2 is the restriction enzyme part and functional map of a plasmid pPSJ189.

[0014] Detailed explanation this invention offers the isolated DNA compound including the DNA array which is carrying out the code of the mammals inflow peptide transporter activity. The amino acid sequence of an inflow peptide transporter is shown as an array number 1 among an array table. The DNA array which is carrying out the code of the inflow peptide transporter is shown as an array number 2 among an array table.

[0015] This contractor will admit that it is possible to build the DNA array from which many which carry out the code of the array number 1 differ with the property of the degeneracy of a gene code. The DNA array shown by the array number 2 is one [mere] of many possible inflow peptide transporter coding arrays. therefore, the structure indicated in the following and the attached example about the desirable DNA compound, vector, and transformant of this invention -- the thing for instantiation -- it is -- it does not pass and does not have the intention of limiting the range of this invention.

[0016] An array can be prepared by various approaches, therefore is limited to no specific preparation means now when the array of an inflow peptide transporter became known. the DNA array of this invention -- a DNA synthesis method, cDNA cloning, genome cloning, and polymerase chain reaction (PCR) -- it can manufacture by law or some approaches including the combination of these approaches. these and other approaches -- Maniatis[-- "molecular cloning : -- a laboratory -- a manual -- " -- Cold Spring Harbor Press -- ColdSpring Harbor Laboratory -- Cold Spring Harbor -- New York --] (1989) -- or -- F . -- M . -- Ausbel -- ** -- [-- " -- molecular biology -- recently -- a protocol -- " -- 1989 --] -- indicating -- having -- **** . The contents of both bibliography of these shall constitute some of these specifications.

[0017] The DNA array of this invention is compoundable using an approach and equipment available as a commercial item. For example, the DNA array of this invention can be manufactured using a solid phase phosphotriester method. A DNA array is compoundable with the amelioration phosphotriester method using the DNA construction block protected completely. such a synthesis method -- substantial -- Itakura et al. -- [1977 and Science 198 : 1056] and Crea[-- Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75 : 575], and Narang et al. -- [1980 and Methods in Enzymology 68 : It can carry out according to the approach of 90]. It adds to the approach by handicraft and is ABS 380A. A DNA array is compoundable using automation synthesizer units, such as a DNA synthesizer (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404). Moreover, polymerase chain reaction can be made to generate a DNA array. For example, refer to the United States patent numbers 4,800,159 and 4,683,202 and the Europe patent public presentation number 0258017 (March 2, 1987 public presentation).

[0018] It can be known widely, and can get down and the approach for a solution and solid phase composition can use various automation synthesizer units available as a commercial item according to a known protocol. for example, Stewart and Young [Solid Phase Synthesis 2nd edition, Pierce Chemical Company, and 1984]; Tam et al. -- [1983 and J.Am.Chem.Assoc.105 : 6442];, and Merrifield et al. -- [1982 and Biochemistry 21 : 5020] -- reference.

[0019] DNA which is carrying out the code of the mammalian inflow peptide transporter activity can be cloned in various vectors by the well-known approach for the time being in the fields. Many suitable vectors including cosmid, a plasmid, a bacteriophage, a baculovirus, and a virus can be used. One of the main requirements to such a vector is being able to carry out the transformation of self's being reproduced and the host cell. Preferably, this vector is a recombinant DNA expression vector which may make the inflow peptide transporter activity of the mammals in which a code is carried out by the DNA array of this invention discover. The usual expression vector contains at least promoterregion, a 5'-untranslation region, coding array, and 3'-untranslation region, a replication origin, a selective marker, and the conclusion section of an imprint. Furthermore, although the array in which a useful vector presupposes that it is possible the reproduction in Escherichia coli is included by this invention, it is usually because it is much more efficient that this prepares plasmid DNA in E.coli from other host organisms.

[0020] The various expression vectors which can be embellished in order to make the new DNA array of this invention discover exist. It does not have the intention of only mentioning as an example the specific vector illustrated in this specification, and limiting the range of this invention. the discovered method — Maniatis[— “molecular cloning It is indicated by :laboratory manual”] or the “latest protocol of molecular biology” [16.3–17.44] (1989). Moreover, the discovered method in *Saccharomyces* is indicated by “the latest protocol of molecular biology” (1989).

[0021] Prokaryon nature vectors, such as a pNH vector (Stratagene Inc., 11099 N.Torrey Pines Rd., LaJolla, CA 92037), a pET vector (Novogen Inc., 565 Science Dr., and Madison WI 53711), and a pGEX vector (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, and NJ 08854), are contained in the vector suitable for using it in the case of this invention operation. For the example of an eukaryon nature vector useful in the case of this invention operation Vector pRc/CMV, pRc/RSV and pREP (it Invitrogen(s)) 11588 Sorrento Valley Baculovirus vectors, such as Rd., San Diego, CA 92121;pVL1392, and pVL1393, pAC360 (Invitrogen); YRP17, YIP5, and YEP24 () [New] Yeast vectors, such as England Biolabs, Beverly, and MA, And *Picchia* vectors, such as pRS403, pRS413 (Stratagene Inc.), and pHL-D1 (Phillips Petroleum Co., Bartlesville, -74004), are contained.

[0022] A functional promotor is contained in the promotor for using it in the expression vector of this invention in a prokaryotic cell or an eukaryotic cell. In a prokaryotic cell, a lactose (lac) control member, a bacteriophage lambda (pL) control member, an arabinose control member, a tryptophan (trp) control member, bacteriophage T7 control members, and these hybrids are contained in a functional promotor. In an eukaryotic cell, *Saccharomyces* promoters, such as *Picchia* promoters, such as baculovirus promoters, such as an Epstein Barr virus promotor, an adenovirus promotor, an SV40 promotor, a Rous-sarcoma-virus promotor, a cytomegalovirus, and an AcMNPV polyhedron promotor, and an alcohol oxidase promotor, a gal4 inductivity promotor, and a PGK compositionality promotor, are contained in a functional promotor.

[0023] Furthermore, the vector of this invention can contain one of the various markers of a large number which make easy selection of a host cell by which the transformation was carried out of arbitration. The gene related to the enzyme relevant to temperature sensitivity, drug tolerance, or the phenotype property of a host organism is contained in such a marker.

[0024] After inserting into a vector the DNA array which is carrying out the code of the mammalian inflow peptide transporter activity, the vector can be used and the transformation of the host cell can be carried out. Usually, the cellularity living thing containing the prokaryotic cell or eukaryotic cell by which a transformation may be carried out to a host cell by the vector containing DNA of this invention is included. The transformation of a cell and the approach of transfection are common knowledge for the time being in the fields, and can be found out in common bibliographies, such as Maniatis et al. (1989) and the “latest protocol of molecular biology” (1989).

[0025] This invention is not limited to the use to a specific host cell. The vector of this invention can be introduced into many host cells, and can be made to discover. The host cell to which the transformation of this invention was carried out can be cultivated in the usual nutrition culture medium embellished suitably because of induction of a promotor, selection of a transformant, or magnification of a gene. Probably culture conditions, such as temperature and pH, are conditions already used about the host cell chosen for the manifestation, and will be clear to this contractor.

[0026] It depends for selection of a specific host cell on the specific expression vector used in order to make the inflow peptide transporter activity-coding DNA compound of this invention discover to some extent. After introducing to the host cell of the vector of this invention, a transformant can be chosen based on selectable phenotype. The selectable marker which exists on an expression vector can give this selectable phenotype.

[0027] In a suitable host cell, for example, prokaryotic cell; Chinese hamster ovary cell CHO-DHFR-[American Type Culture Collection, such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (ATCC), From 12301 Parklawn Drive, Rockville, and Maryland 20852-1776, under trust number ATCC CRL-9096 Available], Chinese hamster ovary cell CHO-K1 (ATCC CCL-61), The Syrian hamster cell AV12 (ATCC CRL 1573), A *Homo sapiens* lymphocyte CCRF-CEM cell, a *Homo sapiens* neuroblastoma cell, the Buta kidney cell (LLC-PK1, ATCC CL101), and liver, A brain, Eukaryotic cells, such as the skin and a cell of the suprarenal gland origin; yeast cell; *Spodoptera frugiperda* Sf9 () which reaches *Saccharomyces cerevisiae* and contains *Picchia pastoris* [ATCC] The insect cell

containing the Leucania larva cell of CRL 1711 etc.; a fungus cell including an Aspergillus kind is contained.

[0028] the manifestation in a prokaryotic cell and an eukaryotic cell — Maniatis et al. (1989), Kaufmann["the principle of gene engineering, and an approach", and J.K — the volume on Setlow, and Plenum Press 9 : It is indicated by 155 and] (1988). The manifestation of yeast is indicated by Barr and others [the volume gene engineering" of "yeast, and on Butterworth, and Boston 1989]. The manifestation in an insect cell is Maeda[1989, "the annual report of entomology", and 34. : It is indicated by 351].

[0029] The DNA array shown by the array number 2 was acquired from the cDNA clone prepared from mRNA of Caco-2 cellular in. Caco-2 cellular in is [Dantzig and Bergin which are the Homo sapiens colonic gland cancer cellular in where incorporating an antibiotic by the inflow peptide transporter is shown, 1990, and Biochim.Biophys.Acta 1027. : 211-217; Dantzig and others, 1992, Biochim.Biophys.Acta 1112 : 167-173]. Caco-2 cell is available under ATCC to the trust number ATCC HTB37.

[0030] The instantiation vector of this invention was introduced into Escherichia coli RR1 or E.coli DH5 alpha cell, and it *****ed to Northern Regional Research Laboratories (NRRL) (Peoria and Illinois 61604) on January 21, 1993, and carried out to a part of permanent storage culture collection. A specific culture and a specific trust number are shown in Table 1.

[Table 1]

Table [] 1 culture Trust number E.coli K12 — DH5 alpha/pPSJ 179 NRRL B-21041 E.coli K12 RR1/pPSJ189 NRRL B- 21042 [0031] A culture comes to hand and a plasmid is isolated with a conventional method. Subsequently, in order to make a mammals inflow peptide transporter produce, this plasmid can be introduced into a direct host cell.

[0032] Die length is about 8500 base pairs, and a plasmid pPSJ179 contains DNA which is carrying out the code of the inflow peptide transporter of the Caco-2 cell origin. The plasmid pPSJ179 built the 3.4 kb XbaI-HindIII cDNA restriction enzyme fragmentation containing inflow peptide transporter-coding DNA by carrying out cloning into vector pRc/RSV (Invitrogen) available as a commercial item. Since the inflow peptide transporter had the HindIII restriction enzyme part inside, it used partial restriction enzyme digestion in cloning of 3.4kb XbaI-HindIII fragmentation. A plasmid pPSJ179 contains the inflow peptide transporter gene installed so that it might be discovered from the neomycin resistance gene and Rous-sarcoma-virus (RSV) promotor for the selection in the ampicillin resistance gene for the selection in Escherichia coli, and an eukaryotic cell. The restriction enzyme and functional map of a plasmid pPSJ179 are shown in attached drawing 1.

[0033] A plasmid pPSJ189 is also the example of the vector of this invention. A plasmid pPSJ189 is the magnitude of about 12.2 kilobases. A plasmid pPSJ189 contains the KpnI-SpeI restriction fragment of the 3.4 kilobase pairs containing inflow peptide transporter-coding DNA cloned in the variant with which Plasmid pHD was embellished. Plasmid pHD was embellished so that the restriction enzyme part for making easy cloning of the KpnI-SpeI restriction fragment of the 3.4 kilobase pairs containing inflow peptide transporter coding DNA might be included. Plasmid pHD is indicated in the Europe patent public presentation number 0245949 (November 19, 1987 public presentation). A plasmid pPSJ189 contains BK enhancer and the adenovirus main late promoters which were installed for the hygromycin tolerance gene for the selection in the ampicillin resistance gene for the selection in Escherichia coli, and an eukaryotic cell, a DHFR gene, and inflow peptide transporter gene expression. The restriction enzyme and functional map of a plasmid pPSJ189 are shown in attached drawing 2.

[0034] This contractor will admit that inflow peptide transporter coding DNA can be started as various restriction enzyme fragmentation from plasmids pPSJ179 and pPSJ189, and may be cloned in many expression vectors. For example, the inflow peptide transporter coding activity DNA can be started as KpnI-SpeI restriction enzyme fragmentation of 3.4 kilobase pairs from a plasmid pPSJ189 as 3.4 kilobase-pair HindIII-XbaI restriction enzyme fragmentation from a plasmid pPSJ179. This contractor will accept the thing for which partial restriction enzyme digestion will be required, in order to prepare the DNA fragment which carries out the code of the perfect inflow peptide transporter to because of that of the existence of many restriction enzyme parts in plasmid DNA. Identification, isolation, and the approach for carrying out cloning are common knowledge for the time being in the

fields about various restriction enzyme fragmentation including the inflow peptide transporter coding activity DNA.

[0035] other transporters by which structure is similar to the inflow peptide transporter of this invention based on the indication of this specification — polymerase chain reaction (PCR) — it can identify with the combination of the approaches of common knowledge, such as law and DNA hybridization, or these approaches. An inflow peptide transporter consists of an extracellular field (about amino acid residue 1-778 of the array number 1), and a transformer MENN bulan field (about amino acid residue 778-809 of the array number 1). An extracellular field is [Takeichi and M. which are very much related to the family of the protein known as cadherin, 1990, and Annu.Rev.Biochem.59. : 237-252]. A cadherin family has the outside of a highly preservable cell, and an intracellular field. However, an inflow peptide transporter is [Klinter which does not have the intracellular field of shelf life where it is shown that it is required for the functional activity of cadherin, 1992, and Cell 69. : 225-236]. The protein related to an inflow peptide transporter can be identified using the hybridization method based on this difference between cadherin and an inflow peptide transporter.

[0036] Under a certain hybridization method, a probe specific to a cadherin family and the shelf-life ! extracellular field of an inflow peptide transporter, and the shelf-life intracellular field of b cadherin family is obtained. Such a probe can be obtained using the PCR method. In this case, template DNA may be cDNA obtained from the cellular in of a different tissue form which discovers genomic DNA or inflow peptide transporter activity, and cadherin. The kidney, an intestinal tract, the cell of the pancreas origin, or the endothelial cell of the "blood-brain" gateway origin is contained in the possible source of supply for template DNA.

[0037] A specific probe is first used for the highly preservable extracellular field of a cadherin family and an inflow peptide transporter in a hybridization experiment, and the gene which has the extracellular field of cadherin and other peptide transporters is identified. Subsequently, the gene which carries out the code of the cadherin is identified, using the probe obtained from the intracellular field of cadherin as a hybridization probe. Although it reacts with the probe to an extracellular field, the candidate of an inflow peptide transporter deserves the gene to which the probe to an intracellular field does not react. These genes are cloned in a recombinant DNA expression vector, and it introduces into a suitable host cell. Subsequently, assay of the host cell by which the transformation was carried out is carried out about the manifestation of inflow peptide transporter activity.

[0038] The same result can be mentioned using a different-species hybridization method. In this case, a possible inflow peptide transporter is distinguished from cadherin using the DNA fragment showing a part for the outside of the cell of cadherin, and the interior of a cell.

[0039] Other genes which are carrying out the code of the peptide transportation activity using the conventional hybridization method using DNA which is carrying out the code of the inflow peptide transporter of this invention, or the probe based on the part of the arbitration can be identified. For example, the gene which has peptide transportation activity using the probe based on the array number 2 or its part can be identified. Moreover, the gene which has peptide transportation activity using the probe based on the amino acid sequence of the array number 1 or its part which degenerated can be identified. Maniatis and others (1989) is indicating the hybridization method.

[0040] As shown above, this invention offers the approach for measuring incorporation of the compound by the inflow peptide transporter. This approach is useful in prediction of the oral bioavailability of the compound by the inflow peptide transporter in Homo sapiens. A variety of compounds can be examined about the incorporation by the inflow peptide transporter. A small peptide and a small remedy object, for example, an antibiotic, ACE inhibitor, and renin inhibitor are contained in the example of such a compound. These compounds are mere instantiation. This approach is applicable to any compounds as a matter of fact, in order to examine the capacity incorporated by the inflow peptide transporter. Therefore, in one mode, this invention contacts the cell and this compound by which the transformation was carried out by the recombinant DNA expression vector which brings about the manifestation of a mammals inflow peptide transporter activity which offers the approach for measuring incorporation of the compound to the inside of a cell of consisting of the following processes, and carries out assay about transportation of this compound

to the inside of b this cell.

[0041] The example of the recombinant DNA expression vector which brings about the manifestation of useful inflow peptide transporter activity in the approach of this invention was indicated above. Such a recombinant DNA expression vector can be adjusted for the optimal manifestation of the inflow peptide transporter activity in the host cell chosen for a manifestation.

[0042] The various cells containing the cell indicated above can be used in this approach. Especially the cell that lacks inflow peptide transporter activity before the transformation in the recombinant DNA expression vector of this invention is useful in this method. The cell which has incorporation of a measurable compound before the transformation in the recombinant DNA expression vector of this invention is also useful. Assay of the cell by which the transformation was carried out by the recombinant DNA expression vector which is carrying out the code of the inflow peptide transporter activity in which case can be carried out about increase of transportation of the trial compound to this cell.

[0043] In this mode of this invention into a useful cell For example, prokaryotic cells, such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*; Chinese hamster ovary cell CHO-DHFR-[American Type Culture Collection (ATCC), From 12301 Parklawn Drive, Rockville, and Maryland 20852-1776, under trust number ATCC CRL-9096 Available], Chinese hamster ovary cell CHO-K1 (ATCC CCL-61), The Syrian hamster cell AV12 (ATCC CRL 1573), A *Homo sapiens* lymphocyte CCRF-CEM cell, a *Homo sapiens* neuroblastoma cell, the Buta kidney cell (LLC-PK1, ATCC CL101), and liver, A brain, Eukaryotic cells, such as the skin and a cell of the suprarenal gland origin; yeast cell; *Spodoptera frugiperda* Sf9 () which reaches *Saccharomyces cerevisiae* and contains *Picchia pastoris* [ATCC] The insect cell containing the *Leucania larva* cell of CRL 1711 etc.; a fungus cell including an *Aspergillus* kind is contained. Moreover, probably, the peptide transportation deletion mutant of the cell which made reference upwards will be useful in the approach of this invention. such a peptide transportation deletion mutant -- *Escherichia coli* [— DeFelice and others, 1973, and J.Bacteriol.116 : 751-7560] and yeast [— Island and others, 1991, and Curr.Genet.20 : 457-463; Marder and others, 1978, and J.Bacteriol.136 : It is indicated about 1174-1177].

[0044] Probably, the specific vectors used in order to make an inflow peptide transporter discover as shown above differ according to the host cell to be used.

[0045] Incorporation of the compound by the transformer FEKUTANTO cell which has discovered inflow peptide transporter activity can be measured by various approaches. measurement of an appearance of a trial compound host intracellular to these approaches, i.e., this cell, — dissolving — a melt sample — a high speed liquid chromatography — or when the radiation label of this compound is carried out, measurement by analyzing a compound by detection of radioactivity is included. Moreover, other properties related to a specific trial compound can be measured. That is, in order to screen a specific compound, the assay usually used can be used. for example, the capacity of a compound to permute association of the ligand to a receptor in receptor assay (or enhancement), the capacity of the compound which checks a related enzyme (or stimulus), the capacity of the compound which checks growth of a living thing (or stimulus), or a trial compound has — will come out and I will be — being of a certain kind — others — a property can be used. Inflow peptide transporter activity can be measured using various assays containing the assay currently indicated by Bradner and Claridge [volume 1984, "screening system in antineoplastic drug", and on W.A.Remers, Wiley-Interscience Pub., John Wiley and Sons, and Inc.N.Y., and NY].

[0046]

[Example] It has the intention of the example shown below helping much more understanding of this invention. The matter, the specific kind, and the specific conditions of being used have the intention of explaining this invention in more detail, and do not tend to limit the just range of this invention. The approach for actuation of DNA and analysis was performed as essentially indicated by Maniatis and others (1989). The conditions for a restriction enzyme reaction are manufacturer [Boehringer Mannheim (BM), Indianapolis, and IN.; New England Biolabs (NEB), Beverly, MA; The conditions currently recommended by Bethesda Research Labs (BRL), Gaithersburg, and MD] were used.

[0047] Transfection of the example 1 Chinese hamster ovary cell (CHO-K1 and ATCC CCL 61) was carried out by the plasmid pPSJ179 using the calcium precipitate protocol indicated in the Stratagene mammalian transfection kit (Stratagene Catalog # 200285). A plasmid pPSJ179 can be

isolated from *Escherichia coli* K12 DH5 alpha/pPSJ 179 (NRRL B-21041) using the usual alkali-SDS method (Maniatis and others, 1989). The transfection method of a calcium precipitate protocol was performed as follows. It is calcium of 20microg mostly about CHO-K1 cell (one day after 100mm culture plate and plaiting) of complete growth. — It incubated for 20 minutes at 37 degrees C with the DNA sample which precipitated. The DNA sample was either a plasmid pPSJ179 or plasmid pRc/RSV as contrast. Then, this cell was proliferated for three days in F12 culture medium which contains fetal calf serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT 84321) 10%. The culture medium was permuted by the growth medium which contains a selection drug and G-418 sulfate (Gibco, Grand Island, NY) by ml in 300microg /, and the cell was proliferated for 13 days at 37 degrees C among 3% CO2 incubator next. The colony chosen for next research was proliferated in the selected time amount and the 37-degree C selected selective medium among 5% CO2 incubator. Transformer FEKUTANTO was evaluated about the manifestation of an inflow peptide transporter using the reactant monoclonal antibody to enzyme joint immune absorbance assay (ELISA) and an inflow peptide transporter. It chose for transportation research of the clone which discovered the inflow peptide transporter antigen of level higher than contrast. according to an exception method — Dantzig et al. — [1990 and Biochim.Biophys.Acta 1027 : Choose a clone about the manifestation of an inflow peptide transporter using the approach indicated by 211-217]. Furthermore, the clone containing DNA which is carrying out the code of the inflow peptide transporter can be identified using the hybridization method using the probe based on the array number 1.

[0048] The clone chosen in the example 2 example 1 was evaluated about incorporation of antibiotic cefalexin. Cefalexin is available from Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). CHO-K1 cell (per well — 0.5 to 1x105 cells) by which transfection was carried out — above — Costar24— a well — it was made to increase for three days in a plate The R balanced salt solution (Gibco, Grand Island, NY) (Trans-EBSS) including 25mM HEPES and pH7.4 washed the complete growth cell, it incubated for 45 minutes at 37 degrees C, and, subsequently suction removed Trans-EBSS. This cell was incubated under existence of 1mM [14C] cefalexin among the R balanced salt solution (sodium non-**, Trans-EBSS) of sodium non-** including the 120mM choline chloride, 25mM MES, and pH6.0. Then, washed the cell by ice-cooling Trans-EBSS and pH7.4, it was made to dissolve in 0.2N NaOH, and the part was extracted for scintillation count measurement.

[0049] Typical transformer FEKUTANTO (clone 9) showed incorporation of high [14C] cefalexin more nearly intentionally than contrast. It was shown by next research that incorporation of the cefalexin of 1mM by this transformer FEKUTANTO is checked by the existence of 50mM(s) of Gly-L-Pro (GP) which is the dipeptide which competes with the incorporation by the inflow peptide transporter. By incubating a cell with 1mM [14C] cefalexin and GP, incorporation of the drug in typical transformer FEKUTANTO (clone 9) decreased to the level of a reference cell. Furthermore, transportation of 1mM [14C] cefalexin by the reference cell was not checked by the Gly-L-Pro dipeptide. The result of these researches is shown in Table 2.

[Table 2]

table 2 [] A sample Incorporation of 14C-cefalexin (nmol/mg all cell protein) A clone 9 6.6**0.3
Clone 9+GP 4.5**0.03 Contrast 3.3**0.6 Contrast +GP 4.7**0.4 [0050]

[Layout Table]

[0051] array number: — die-length [of one array]: — mold [of 832 arrays]: — amino acid topology:
— class [of straight chain-like array]: — protein array: — Met Ile Leu Gln Ala His Leu His Ser Leu
Cys Leu Leu Met Leu 1 5 10 15 Tyr Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Gln Glu Gly Lys Phe Ser Gly Pro 20 25
30 Leu Lys Pro Met Thr Phe Ser Ile Tyr Glu Gly Gln Glu Pro Ser 35 40 45 Gln Ile Ile Phe Gln Phe
Lys Ala Asn Pro Pro Ala Val Thr Phe 50 55 60 Glu Leu Thr GlyGlu Thr Asp Asn Ile Phe Val Ile Glu
Arg Glu 65 70 75 Gly Leu Leu TyrTyr Asn Arg Ala Leu Asp Arg Glu Thr Arg Ser 80 85 90 Thr His Asn
LeuGln Val Ala Ala Leu Asp Ala Asn Gly Ile Ile 95 100105 Val Glu Gly Pro Val Pro Ile Thr Ile Glu
ValLys Asp Ile Asn 110 115 120 Asp Asn Arg Pro Thr Phe Leu Gln Ser Lys Tyr Glu Gly Ser Val 125
130 135 Arg Gln Asn Ser Arg Pro Gly Lys Pro Phe Leu Tyr Val Asn Ala 140 145 150 Thr Asp Leu
Asp Asp Pro Ala Thr Pro Asn Gly Gln Leu Tyr Tyr 155 160 165 Gln Ile Val Ile Gln Leu Pro Met Ile
Asn Asn Val Met Tyr Phe 170 175 180 Gln Ile Asn Asn Lys Thr Gly Ala Ile Ser Leu Thr Arg Glu Gly
185 190 195 Ser Gln GluLeu Asn Pro Ala Lys Asn Pro Ser Tyr Asn Leu Val 200 205 210 Ile SerVal
Lys Asp Met Gly Gly Gln Ser Glu Asn Ser Phe Ser 215 220 225 Asp Thr Thr Ser Val Asp Ile Ile Val

Thr Glu Asn Ile Trp Lys 230 235 240 Ala Pro Lys Pro Val Glu Met Val Glu Asn Ser Thr Asp Pro His
 245 250 255 Pro Ile Lys Ile Thr Gln Val Arg Trp Asn Asp Pro Gly Ala Gln 260 265 270 Tyr Ser Leu
 Val Asp Lys Glu Lys LeuPro Arg Phe Pro Phe Ser 275 280 285 Ile Asp GlnGlu Gly Asp
 Ile-Tyr-Val-Thr-Gln Pro Leu Asp Arg 290 295 300Glu Glu Lys Asp Ala-Tyr-Val-Phe-Tyr Ala Val Ala
 Lys Asp-Glu 305 310 315Tyr Gly Lys Pro Leu-Ser-Tyr-Pro-LeuGlu Ile His Val Lys Val 320 325330
 Lys Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Thr Cys Pro Ser Pro Val Thr 335 340 345 Val Phe Glu Val Gln Glu
 Asn Glu Arg Leu Gly Asn Ser Ile Gly 350 355 360 Thr Leu Thr Ala His Asp Arg Asp Glu Glu Asn Thr
 Ala Asn Ser 365370 375 Phe Leu Asn Tyr Arg Ile Val Glu Gln Thr Pro Lys Leu Pro Met 380 385 390
 Asp Gly Leu Phe Leu Ile Gln ThrTyr Ala Gly Met Leu Gln Leu 395 400 405 AlaLys Gln Ser Leu Lys
 Lys Gln Asp Thr Pro Gln Tyr Asn Leu 410 415 420 Thr Ile Glu Val Ser Asp Lys Asp Phe Lys Thr Leu
 Cys Phe Val 425 430 435 Gln Ile Asn ValIleAsp Ile Asn Asp Gln Ile Pro Ile Phe Glu 440 445 450 Lys
 Ser Asp Tyr Gly Asn Leu Thr Leu Ala Glu Asp Thr Asn Ile 455 460 465 Gly Ser Thr Ile LeuThr Ile Gln
 Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro 470 475 480 Phe Thr Gly Ser SerLys Ile Leu Tyr His Ile Ile Lys Gly Asp
 485 490 495 Ser Glu Gly Arg LeuGly Val Asp Thr Asp Pro His Thr Asn Thr 500 505 510 Gly Tyr Val
 Ile IleLys Lys Pro Leu Asp Phe Glu Thr Ala Ala 515 520 525 Val Ser Asn Ile Val Phe Lys Ala Glu Asn
 Pro Glu Pro Leu Val 530 535 540 Phe Gly Val Lys TyrAsn Ala Ser Ser Phe Ala Lys Phe Thr Leu 545
 550 555 Ile Val Thr Asp Val Asn Glu Ala Pro Gln Phe Ser Gln His Val 560 565 570 Phe Gln Ala Lys
 Val Ser Glu Asp Val Ala Ile Gly Thr Lys Val 575 580 585 Gly Asn Val Thr AlaLys Asp Pro Glu Gly Leu
 Asp Ile Ser Tyr 590 595 600 Ser-Leu-Arg-Gly-Asp Thr Arg Gly Trp Leu-Lys-Ile-Asp-His-Val 605
 610 615Thr Gly Glu Ile Phe-Ser-Val-Ala-Pro Leu Asp Arg Glu Ala-Gly 620 625 630Ser Pro Tyr A rg
 Val Gln Val Val Ala Thr Glu Val Gly Gly Ser 635 640645 Ser Leu Ser Ser Val Ser Glu Phe His Leu Ile
 Leu Met Asp Val 650 655 660 Asn Asp Asn Pro Pro Arg Leu Ala Lys Asp Tyr Thr Gly Leu Phe 665
 670675 Phe Cys His Pro Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Ile Phe Glu Ala 680 685 690 Thr Asp Asp Asp
 Gln His Leu Phe Arg Gly Pro His Phe Thr Phe 695 700 705 Ser Leu Gly Ser Gly Ser Leu Gln Asn Asp
 Trp Glu Val Ser Lys 710 715 720 Ile Asn Gly Thr His Ala Arg Leu Ser Thr Arg His Thr Asp Phe 725
 730 735 Glu Glu Arg Ala Tyr Val Val Leu IleArg Ile Asn Asp Gly Gly 740 745750 Arg Pro Pro Leu Glu
 GlyIle Val Ser Leu Pro Val Thr Phe Cys 755 760 765 Ser Cys Val Glu Gly Ser Cys Phe Arg Pro Ala
 Gly His Gln Thr 770 775 780 Gly Ile Pro Thr Val Gly Met Ala Val Gly Ile Leu Leu Thr Thr 785 790 795
 Leu Leu Val Ile Gly Ile Ile Leu Ala Val Val Phe Ile Arg Ile 800 805 810 Lys Lys Asp Lys Gly Lys Asp
 Asn Val Glu Ser Ala Gln Ala Ser 815 820 825 Glu Val Lys Pro Leu Arg Ser 830 832 [0052] array
 number: — die-length [of two arrays]: — mold [of 2499 arrays]: — number [of nucleic-acid
 chains]: — double strand topology: — class [of straight chain-like array]: — DNA array: —
 ATGATACTTC AGGCCCATCT TCACTCCCTG TGTCTTCTTA TGCTTTATTT 50 GGCAACTGGA
 TATGGCCAAG AGGGGAAGTT TAGTGGACCC CTGAAACCCA 100 TGACATTTTC TATTTATGAA
 GGCCAAGAAC CGAGTCAAAT TATATTCCAG 150 TTTAAGGCCA ATCCTCCTGC TGTGACTTTT
 GAACTAACTG GGGAGACAGA 200 CAACATATTT GTGATAGAAC GGGAGGGACT TCTGTATTAC
 AACAGAGCCT 250 TGGACAGGGA AACAAGATCT ACTCACAATC TCCAGGTTGC AGCCCTGGAC
 300 GCTAATGGAA TTATAGTGGG GGGTCCAGTC CCTATCACCA TAGAAGTGAA350
 GGACATCAAC GACAATCGAC CCACGTTTCT CCAGTCAAAG TACGAAGGCT 400CAGTAAGGCA
 GAACTCTCGC-CCAGGAAAGC-CCTTCTTGTA-TGTCAATGCC 450ACAGACCTGG
 ATGATCCGGC-CACTCCCAAT-GGCCAGCTTT-ATTACCAGAT 500TGTCATCCAG
 CTTCCCATGA-TCAACAATGT-CATGTACTTT-CAGATCAACA 550ACAAAACGGG AGCCATCTCT
 CTTACCCGAG-AGGGATCTCA GGAATTGAAT 600CCTGCTAAGA ATCCTTCCTA TAATCTGGTG
 ATCTCAGTGA AGGACATGGG650 AGGCCAGAGT GAGAATTCCT TCAGTGATAC CACATCTGTG
 GATATCATAG 700 TGACAGAGAA TATTTGGAAA GCACCAAAAC CTGTGGAGAT GGTGGAAAAC
 750 TCAACTGATC CTCACCCCAT CAAAATCACT CAGGTGCGGT GGAATGATCC 800
 CGGTGCACAA TATTCCTTAG TTGACAAAGA GAAGCTGCCA AGATTCCCAT 850 TTTCAATTGA
 CCAGGAAGGA GATATTTACG TGA CTGAGCC CTTGGACCGA 900GAAGAAAAGG ATGCATATGT
 TTTTATGCA GTTGCAAAGG ATGAGTACGG950 AAAACCACTT TCATATCCGC TGGAATTCA
 TGTAAGAGTT AAAGATATTA 1000 ATGATAATCC ACCTACATGT CCGTCACCAG TAACCGTATT
 TGAGGTCCAG 1050 GAGAATGAAC GACTGGGTAA CAGTATCGGG ACCCTTACTG CACATGACAG
 1100 GGATGAAGAA AATACTGCCA ACAGTTTTCT AAACACAGG ATTGTGGAGC 1150
 AAACCCCAA ACTTCCCATG GATGGACTCT TCCTAATCCA AACCTATGCT 1200GGAATGTTAC
 AGTTAGCTAA ACAGTCCTTG AAGAAGCAAG ATACTCCTCA1250 GTACAACTTA ACGATAGAGG

TGTCTGACAA AGATTTCAAG ACCCTTTGTT 1300 TTGTGCAAAT CAACGTTATT GATATCAATG
ATCAGATCCC CATCTTTGAA 1350 AAATCAGATT ATGGAAACCT GACTCTTGCT GAAGACACAA
ACATTGGGTC 1400 CACCATCTTA ACCATCCAGG CCACTGATGC TGATGAGCCA TTTACTGGGA
1450 GTTCTAAAAT TCTGTATCAT ATCATAAAGG GAGACAGTGA GGGACGCCTG
1500GGGGTTGACA CAGATCCCCA TACCAACACC GGATATGTCA TAATTA AAAA1550
GCCTCTTGAT TTTGAAACAG CAGCTGTTTC CAACATTGTG TTCAAAGCAG 1600 AAAATCCTGA
GCCTCTAGTG TTTGGTGTGA AGTACAATGC AAGTTCTTTT 1650 GCCAAGTTCA CGCTTATTGT
GACAGATGTG AATGAAGCAC CTCAATTTTC 1700 CCAACACGTA TTCCAAGCGA AAGTCAGTGA
GGATGTAGCT ATAGGCACTA 1750 AAGTGGGCAA TGTGACTGCC AAGGATCCAG AAGGTCTGGA
CATAAGCTAT 1800TCACTGAGGG GAGACACAAG AGGTTGGCTT AAAATTGACC
ACGTGACTGG1850 TGAGATCTTT AGTGTGGCTC CATTGGACAG AGAAGCCGGA AGTCCATATC
1900 GGGTACAAGT GGTGGCCACA GAAGTAGGGG GGTCTTCCTT AAGCTCTGTG 1950
TCAGAGTTCC ACCTGATCCT TATGGATGTG AATGACAACC CTCCCAGGCT 2000 AGCCAAGGAC
TACACGGGCT TGTTCCTCTG CCATCCCCTC AGTGCACCTG 2050 GAAGTCTCAT TTTGGAGGCT
ACTGATGATG ATCAGCACTT ATTTGCGGGT 2100CCCCATTTTA CATTTTCCCT CGGCAGTGGA
AGCTTACAAA ACGACTGGGA2150 AGTTTCCAAA ATCAATGGTA CTCATGCCCG ACTGTCTACC !
AGGCACACAG 2200 ACTTTGAGGA GAGGGCGTAT GTCGTCTTGA TCCGCATCAA TGATGGGGGT
2250CGGCCACCCT TGGAAGG CAT-TGTTTCTTTA-CCAGTTACAT-TCTGCAGTTG
2300TGTGGAAGGA AGTTGTTTCC-GGCCAGCAGG-TCACCAGACT-GGGATACCCA
2350CTGTGGGCAT GGCAGTTGGT-ATACTGCTGA-CCACCCTTCT-GGTGATTGGT
2400ATAATTTTAG CAGTTGTGTT-TATCCGCATA-AAGAAGGATA-AAGGCAAAGA
2450TAATGTTGAA AGTGCTCAAG CATCTGAAGT CAAACCTCTG AGAAGCTGA 2499

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] They are the restriction enzyme part of a plasmid pPSJ179, and the mimetic diagram of a functional map.

[Drawing 2] They are the restriction enzyme part of a plasmid pPSJ189, and the mimetic diagram of a functional map.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(J P)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261761

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl. ⁴	級別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/12	ZNA			
5/10				
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		8412-4B	5/ 00	B
審査請求 未請求 発明の数 9 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平6-11572

(22)出願日 平成6年(1994)2月3日

(31)優先権主張番号 0 1 3 4 6 2

(32)優先日 1993年2月4日

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 590005922

イーライ・リリー・アンド・カンパニー
ELI LILLY AND COMP
ANY

アメリカ合衆国46285インディアナ州イン
ディアナポリス市、リリー・コーポレイ
ト・センター (番地の表示なし)

(72)発明者 アン・ホリンズ・ダンウィグ

アメリカ合衆国47933インディアナ州クロ
ーフォースビル、ツイン・オークス18番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳類の流入ペプチド輸送体

(57)【要約】

【構成】 哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードする単離されたDNA化合物および組換えDNAベクター、さらにこれらのベクターで形質転換された宿主細胞および組換えDNA法により哺乳類の流入ペプチド輸送体活性を製造するための方法が提供される。また、流入ペプチド輸送体により細胞中に輸送される化合物を同定するための方法が提供される。

【効果】 本発明の流入ペプチド輸送体によりある化合物の細胞への取り込みを測定することにより、該化合物の経口バイオアベイラビリティを予測することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列を含む単離されたDNA化合物。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードしているDNA配列を含む請求項1に記載の単離されたDNA化合物。

【請求項3】 配列番号2のDNA配列を含む請求項2に記載の単離されたDNA化合物。

【請求項4】 請求項1、2または3に記載のDNA配列を含む組換えDNAベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項6】 ヒト流入ペプチド輸送体活性を発現させる以下の工程からなる方法：

(1) 以下の(a)および(b)を含む組換えDNA発現ベクターを用いて宿主細胞の形質転換を行い：

(a) 該宿主細胞中で機能するプロモーターおよび翻訳活性化配列；および (b) 該プロモーターおよび翻訳活性化配列から発現するように設置したヒト流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列；

(2) 工程(1)において形質転換された該宿主細胞をヒト流入ペプチド輸送体活性の発現に適当な条件下で培養する。

【請求項7】 宿主細胞が請求項4に記載の組換えDNA発現ベクターで形質転換される請求項6に記載の方法。

【請求項8】 化合物の細胞内への取り込みを測定するための以下の工程からなる方法：

(a) ヒト流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞と該化合物を接触させ；そして (b) 該細胞中への該化合物の輸送についてアッセイする。

【請求項9】 細胞が請求項4に記載の組換えDNA発現ベクターで形質転換されている請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、組換えデオキシリボ核酸(以下「DNA」)法の分野に関する。本発明は、プロトン-依存性の流入ペプチド輸送担体(以下「流入ペプチド輸送体」)活性をコードしているDNAを含む単離されたDNA化合物を提供する。さらに、組換えDNAベクターおよび宿主細胞を提供する。

【0002】

【従来の技術】 哺乳類細胞において、ペプチドはいくつかの異なる輸送担体により細胞内および細胞外へ輸送される。機能的に、ペプチドの細胞内への流入を担う輸送体およびペプチドの細胞外への流出を担う輸送体が存在する。流入輸送体は小さなペプチドおよび関連の化合物を細胞質中に輸送し、イオン勾配を通してエネルギー源

に間接結合している。流出輸送体は、細胞質からペプチドを除去するように機能するいくつかの異なる輸送体からなる。これらには、多くの腫瘍崩壊物ならびに疎水性ペプチドを除去するP-糖タンパク質が含まれる[EndicottおよびLing, 1989, *Annu. Rev. Biochem.* 58:137-171; Sharmaら, 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 5731-5734]。

【0003】 本発明は、細胞または細胞小器官へのペプチドの流入を担うペプチド輸送体に関する。このクラスのペプチド輸送体は、胃腸管、腎臓、胎盤および肝臓リソソームに位置する[Canapathyら, 1991, *Indian J. Biochem. Biophys.* 28: 317-323; Skopickiら, 1991, *Am. J. Physiol.* 261: F670-F678; Canapathyら, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 118-124; BirdおよびLloyd, 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1024: 267-270]。

【0004】 通常、流入ペプチド輸送体は粘膜の上皮細胞の刷子縁に位置する。輸送体の性質は、腸粘膜調製物中、もとの位置で研究され、さらに刷子縁膜小胞、単離された腸細胞および細胞培養物を用いてインビトロで研究されている。ラット、ハムスター、ウサギ、ニワトリ、日本イモリおよびヒトから得た調製物を用いて研究が行われている[CanapathyおよびLeibach, 1991, *Curr. Biol.* 3: 695-701; Saidら, 1988, *Biochim. Biophys. Acta* 941: 232-240; Kramerら, 1988, *Biochim. Biophys. Acta* 939: 167-172; Colongeら, 1990, *Am. J. Physiol.* 259: G775-G780; ShimadaおよびHoshi, 1986, *Jpn. J. Physiol.* 36: 451-465; MatthewsおよびBurston, 1984, *Clinical Sci.*, 67: 541-549]。小さなペプチド(ジおよびトリペプチド)、抗生物質(いくつかの経口β-ラクタムを含む)、経口アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害物質、および経口レニン阻害物質を含む多くの異なる溶質は流入ペプチド輸送体により腸細胞の細胞質中へ輸送される[CanapathyおよびLeibach, 1991, *Curr. Biol.* 3: 695-701; Okanoら, 1986, *J. Biol. Chem.* 261: 14130-14134; Nakashimaら, 1984, *Biochem. Pharm.* 33: 3345-3352; Muranushiら, 1989, *Pharm. Res.* 6: 308-312; FriedmanおよびAmidon, 1989, *Pharm. Res.* 6: 1043-1047; FriedmanおよびAmidon, 1990, *J. Control. Rel.* 13: 141-146; Kramer, 1991, 17th International Congress of Chemotherapy, June 23-28, Berlin, F.R.G., Abstract No. 1415]。

【0005】 流入ペプチド輸送体は、β-ラクタムおよびACE阻害物質を含むある種の経口薬物の吸収において中枢の役割を果たす。調べた27種のβ-ラクタム抗生物質のうち、流入ペプチド輸送体はヒトにおいて経口的に吸収されるものとそうでないものを区別することができた[Tabasら, 1991, 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract No. 164]。さらに、流入ペプチド輸送体は多くの経口β-ラクタム抗生物質を輸送するが非経口のβ-ラクタム抗生物質は輸送しないことが、ヒト腸Caco-2細胞

およびウサギ腸刷毛膜を用いた研究において示されている[Dantzigら, 1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1112: 167-173; Dantzigら, 1992, 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA, Abstract No. 1460; Snyderら, 1992, 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract No. 1461; Okanoら, 1986, *J. Biol. Chem.* 261:14130-14134]。流入ペプチド輸送体の能力を調べてどのACE阻害物質が経口吸収されるかを予測する同様の研究が行われている[FriedmanおよびAmidon, 1989, *Pharm. Res.* 6:1043-1047]。

【0006】流入ペプチド輸送体は、ナトリウム依存性、エネルギー依存性であり、プロトンを基質と共に共輸送し(「プロトン-依存性」)、基質を細胞外に存在するレベルより高いレベルに細胞内に濃縮する能力を呈する[Hoshi, 1986, *Ion Gradient-Coupled Transport*, IN SERM symposium No. 26, Editors: F. AlvaradoおよびC. H. van Os, Elsevier Science Publishers; GanapathyおよびLeibach, 1991, *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:695-701; Ganapathyら, 1991, *Indian J. Biochem. Biophys.* 28: 317-323]。流入ペプチド輸送体の基質特異性はいくつかの種において調べられており、これらは同一ではないにしても非常に類似しているようである[Imaiら, 1992, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 482-486; GanapathyおよびLeibach, 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 14189-14192; YasumotoおよびSugiyama, 1980, *Agric. Biol. Chem.* 44: 1339-1344; Nakashimaら, 1984, *Biochem. Pharmacol.* 33: 3345-3352; Okanoら, 1986, *Biochem. Pharmacol.* 35: 1781-1786]。流入ペプチド輸送体の結合部位はわかっておらず、ゆえに、溶質の結合および輸送に必要な絶対的な化学構造の特徴も未知である。基質および阻害物質の構造と活性の相関の研究が行われ、輸送に必要ないくつかの構造的特徴が解明されている[Baiら, 1991, *Pharm. Res.* 8: 593-599; Snyderら, 1992, 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Oct. 11-14, Anaheim, CA, Abstract No. 1461]。

【0007】流入ペプチド輸送体活性は、放射ラベルされたペニシリンまたは放射ラベルされたセファレキシン類似体を用いた光親和性標識法により、ウサギ腸粘膜から127,000ダルトンの膜タンパク質として同定されている[Kramer, 1987, *Biochim. Biophys. Acta* 905:65-74; Kramerら, 1988, *Biochem. Pharmacol.* 37: 247-2435]。リポソーム中に再構成したウサギ腸粘膜調製物由来の精製127,000ダルトンタンパク質は、結合および輸送活性を与えた[Kramerら, 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1030: 50-59]。ウサギ流入ペプチド輸送体は、*Xenopus laevis*卵母細胞中に機能的に発現されている[Niyamotoら, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 4742-4745]。しかし、哺乳類の流入ペプチド輸送体をコードしているク

ローン化遺伝子の構造またはそのいずれかの成分は、いかなる種に対しても報告されていない。

【0008】流入ペプチド輸送体のクローニングは、この機構を使用する経口吸収薬物の迅速な同定および開発を可能にする方法の開発にとって有用であろう。経口バイオアベイラビリティは多くの薬物の非常に望ましい性質である。開発の初期の段階での薬物の経口バイオアベイラビリティの測定は特に有利であろう。現在、薬物は初めに動物モデルにおいて経口バイオアベイラビリティについて評価される。この工程はごく少数の化合物の選択を必要とし、該化合物の合成はこれらのモデルにおいて評価される程度まで拡大しなければならない。化合物がこれらのモデルを用いて経口的に吸収されない場合には、経口バイオアベイラビリティを達成するためにその化合物の類似体を作成されることが多い。この工程は、時間を浪費し、困難であり、費用がかかる。さらに、動物モデルにおいて良く吸収されるがヒトにより吸収されない化合物の多くの例がある。この従来のアプローチを補足するために、他の評価方法が必要とされている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特に、哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列を含む単離されたDNA化合物、哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしている組換えDNA発現ベクター、およびこれらの組換えDNA発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供するものである。これらの組換えDNA発現ベクターおよび宿主細胞は流入ペプチド輸送体活性を発現させるための方法において有用であり、該方法は以下の工程からなる：

(1) 以下の(a)および(b)を含む組換えDNA発現ベクターを用いて宿主細胞の形質転換を行い：

(a) 該宿主細胞中で機能するプロモーターおよび翻訳活性化配列；および(b) 該プロモーターおよび翻訳活性化配列から発現するように設置した哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列；

(2) 工程(1)において形質転換された該宿主細胞を流入ペプチド輸送体活性の発現に適当な条件下で培養する。

【0010】ヒトにおける薬物の経口的な利用可能性を薬物発見過程の初期段階で予測する能力は有利なものである。この目的のために、本発明は、流入ペプチド輸送体による、ヒトにおける医薬化合物の経口利用可能性の予測において有用な分析手段を提供する。即ち、本発明の1つの態様は、以下の工程からなる細胞による化合物の取り込みを測定するための方法に関する：

(a) 哺乳類流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞と該化合物を接触させ；そして(b) 該細胞中への該化合物の輸送についてアッセイする。

【0011】本発明のこれらの態様および本発明のDNA配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用

などの他の態様を、以下でさらに詳しく説明し、特許請求の範囲に記載する。

【0012】

【課題を解決するための手段】

定義

コード化配列：遺伝子から発現されるタンパク質のアミノ酸残基配列をコードする遺伝子の読み取り枠中のDNA配列。

DHFR：ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子。

遺伝子：遺伝子産物を発現させるように設置したプロモーター、翻訳活性化配列、コード化配列、および3'調節配列を含むDNAセグメント。

流入ペプチド輸送体活性：内部方向性のプロトン勾配の存在に依存する膜を横切る基質の移動。機能的には、内部方向性のpH-勾配(即ち、細胞または膜小胞の内部より外部の方が酸性度が高い)の存在下、輸送体の既知の基質(例えば、小さなペプチド(例えば、ジおよびトリペプチド)、抗生物質(例えば、セファレキシン)、経口アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害物質、および経口レニン阻害物質)の過剰量の不在または存在下での膜を横切る化合物の輸送を測定することにより活性を測定することができる。

プロモーター：DNAの転写を指令または開始させるDNA配列。

組換えDNA発現ベクター：自律的に複製するかまたは組込みを行うあらゆるDNA物質であり、プラスミドを含むがそれに限定されず、ポリペプチドまたはRNAをコードするDNAセグメントを発現させるように設置したプロモーターおよび他の調節配列を含む。

組換えDNA配列：DNAを導いた宿主染色体を除外したあらゆるDNA配列であって、単離、合成または部分合成されたDNA配列を含む。

制限フラグメント：1またはそれ以上の制限酵素の作用により生じたあらゆる線状DNA分子。

翻訳活性化配列：mRNAへと転写されたときにmRNAのタンパク質への翻訳を促進する調節DNA配列。

本明細書中で用いた全てのヌクレオチドおよびアミノ酸省略形は、米国特許商標局により37 C.F.R. § 1.822(b)(1992)に示されるように認められているものである。

【0013】図面の説明

図面に示した制限酵素および機能地図は、本明細書中に開示した組換えDNAベクターのおおよその表示である。制限部位の情報は網羅的なものではない。地図上に実際に示した部位より多くの所定の型の制限酵素部位が存在することがある。図1はプラスミドpP S J 179の制限酵素部位および機能地図である。図2はプラスミドpP S J 189の制限酵素部位および機能地図である。

【0014】詳細な説明

本発明は、哺乳類流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列を含む単離されたDNA化合物を提供する。流入ペプチド輸送体のアミノ酸配列は配列表中、配列番号1として示す。流入ペプチド輸送体をコードしているDNA配列は配列表中、配列番号2として示す。

【0015】遺伝暗号の縮重の性質により、配列番号1をコードする多くの異なるDNA配列を構築することが可能であることを当業者は認めるであろう。配列番号2により示されるDNA配列は、多くの可能な流入ペプチド輸送体コード化配列のうちのほんの1つである。従って、本発明の好ましいDNA化合物、ベクターおよび形質転換体について以下および添付の実施例に開示する構造は例示のためのものであるにすぎず、本発明の範囲を限定することを意図していない。

【0016】流入ペプチド輸送体の配列が既知となった現在、配列はさまざまな方法により調製することができ、ゆえにどの特定の調製手段にも限定されない。本発明のDNA配列は、DNA合成法、cDNAクローニング、ゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、またはこれらのアプローチの組合わせを含むいくつかの方法により製造することができる。これらのそして他の方法は、Maniatisら[「分子クローニング：実験室マニュアル」, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)]またはF.M. Ausbelら[「分子生物学の最近のプロトコール」, 1989]により開示されている。これら両方の参考文献の内容は、本明細書の一部を構成するものとする。

【0017】本発明のDNA配列は、市販品として入手可能な方法および装置を用いて合成することができる。例えば、固相リン酸トリエステル法を用いて本発明のDNA配列を製造することができる。完全に保護されたDNA構築ブロックを用いる改良リン酸トリエステル法によりDNA配列を合成することができる。このような合成法は、実質的にItakuraら[1977, Science 198: 1056]、Creaら[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 575]およびHarangら[1980, Methods in Enzymology 68: 90]の方法に従って行うことができる。手作業による方法に加えて、ABS 380A DNAシンセサイザー(Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404)などの自動化合成装置を用いてDNA配列を合成することができる。また、DNA配列をポリメラーゼ連鎖反応により生成させることができる。例えば、米国特許番号4,800,159および4,683,202、および欧州特許公開番号0258017(1987年3月2日公開)を参照。

【0018】溶液および固相合成のための方法は広く知られおり、既知のプロトコールに従い、市販品として入手可能なさまざまな自動化合成装置を用いることができる。例えば、StewartおよびYoung[Solid Phase Synthesis 2nd edition, Pierce Chemical Company, 1984]; Ta

ら[1983, J. Am. Chem. Assoc. 105: 6442]; および Merrifieldら[1982, Biochemistry 21: 5020]を参照。

【0019】哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNAを、当分野で周知の方法によりさまざまなベクター中にクローン化することができる。コスミド、プラスミド、バクテリオファージ、バキュロウイルスおよびウイルスを含む多くの適当なベクターを用いることができる。このようなベクターに対する主要な必要条件の1つは、自身を複製し得ることおよび宿主細胞を形質転換し得ることである。好ましくは、該ベクターは本発明のDNA配列によりコードされる哺乳類の流入ペプチド輸送体活性を発現させ得る組換えDNA発現ベクターであろう。通常の発現ベクターは、プロモーター領域、5'-非翻訳領域、コード化配列、3'-非翻訳領域、複製起点、選択マーカー、転写終結部位を含む。さらに本発明で有用なベクターは、*Escherichia coli*における複製を可能とする配列を含むが、これは他の宿主生物より*E. coli*においてプラスミドDNAを調製することが通常、一層効率的であるからである。

【0020】本発明の新規なDNA配列を発現させるために修飾することができる多種多様の発現ベクターが存在する。本明細書中に例示する特定のベクターは単に実例として挙げているだけであり、本発明の範囲を限定することを意図していない。発現法は、Maniatisら[「分子クローニング: 実験室マニュアル」]または「分子生物学の最近のプロトコール」[16.3-17.44 (1989)]により開示されている。また、*Saccharomyces*における発現法は「分子生物学の最近のプロトコール」(1989)に開示されている。

【0021】本発明実施の際に使用するに適したベクターには、pNHベクター(Stratagene Inc., 11099 N. Torrey Pines Rd., LaJolla, CA 92037)、pETベクター(Novogen Inc., 565 Science Dr., Madison WI 53711)およびpGEXベクター(Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ 08854)などの原核性ベクターが含まれる。本発明実施の際に有用な真核性ベクターの例には、ベクターpRc/CMV、pRc/RSVおよびpREP (Invitrogen, 11588 Sorrento Valley Rd., San Diego, CA 92121); pVL1392、pVL1393、またはpAC360 (Invitrogen)などのバキュロウイルスベクター; YRP17、YIP5およびYEP24 (New England Biolabs, Beverly, MA)などの酵母ベクター、ならびにpRS403およびpRS413 (Stratagene Inc.)およびpHIL-D1 (Phillips Petroleum Co., Bartlesville, OK 74004)などの*Pichia*ベクターが含まれる。

【0022】本発明の発現ベクターにおいて使用するためのプロモーターには、原核細胞または真核細胞において機能的であるプロモーターが含まれる。原核細胞において機能的なプロモーターには、ラクトース(*lac*)制御要素、バクテリオファージラムダ(*pL*)制御要素、アラ

ビノース制御要素、トリプトファン(*trp*)制御要素、バクテリオファージT7制御要素、およびこれらのハイブリッドが含まれる。真核細胞において機能的であるプロモーターにはEpstein Barrウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス、AcMNPV多面体プロモーターなどのバキュロウイルスプロモーター、アルコールオキシダーゼプロモーターなどの*Pichia*プロモーター、*gal4*誘導性プロモーターおよびPGK構成性プロモーターなどの*Saccharomyces*プロモーターが含まれる。

【0023】さらに、本発明のベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を容易にする多数の各種マーカーのうち任意の1つを含むことができる。このようなマーカーには、温度感受性、薬物耐性、または宿主生物の表現型特性に関連した酵素に関係する遺伝子が含まれる。

【0024】哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列をベクター中に挿入した後に、そのベクターを用いて宿主細胞を形質転換させることができる。通常、宿主細胞には、本発明のDNAを含むベクターで形質転換され得る原核細胞または真核細胞を含む細胞性生物が包含される。細胞の形質転換およびトランスフェクションの方法は当分野で周知であり、Maniatisら(1989)または「分子生物学の最近のプロトコール」(1989)などの一般的な参考文献中に見出すことができる。

【0025】本発明は特定の宿主細胞に対する使用に限定されない。本発明のベクターは多くの宿主細胞中に導入し発現させることができる。本発明の形質転換された宿主細胞は、プロモーターの誘導、形質転換体の選択または遺伝子の増幅のために適当に修飾された通常の栄養培地中で培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞について既に用いられている条件であり、当業者には明らかであろう。

【0026】特定の宿主細胞の選択は、本発明の流入ペプチド輸送体活性—コード化DNA化合物を発現させるために用いる特定の発現ベクターにある程度依存する。本発明のベクターの宿主細胞への導入の後に、選択可能な表現型を基にして形質転換体を選択することができる。この選択可能な表現型は、発現ベクター上に存在する選択可能なマーカーにより付与することができる。

【0027】適当な宿主細胞には、例えば*Escherichia coli*および*Bacillus subtilis*などの原核細胞; チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-DHFR⁻ [American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776から受託番号ATCC CRL-9096の下に入手可能]、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-K1 (ATCC CCL-61)、シリアンハムスター細胞A V 12 (ATCC CRL 1573)、ヒトリンパ球CCRF-CEM細胞、ヒト神経芽腫細胞、ブタ腎臓細胞(LLC

-PK₁, ATCC CL101)および肝臓、脳、皮膚および副腎腺由来の細胞などの真核細胞; *Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia pastoris* を含む酵母細胞; *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC CRL 1711) などのアワヨトウ幼虫細胞を含む昆虫細胞; *Aspergillus* 種を含む菌類細胞が含まれる。

【0028】原核細胞および真核細胞における発現は、Maniatisら(1989)およびKaufmann[「遺伝子工学の原理および方法」, J.K.Setlow編, Plenum Press 9: 155, (1988)]により開示されている。酵母の発現はBarrら[「酵母の遺伝子工学」, Butterworth編, Boston 1989]により開示されている。昆虫細胞における発現はMaeda[1989, 「昆虫学の年報」, 34: 351]により開示されている。

【0029】配列番号2により示されるDNA配列は、Caco-2セルラインのmRNAから調製したcDNAク

ローンから得た。Caco-2セルラインは、流入ペプチド輸送体により抗生物質を取り込むことが示されているヒト結腸腺癌セルラインである[DantzigおよびBergin, 1990, *Biochim.Biophys. Acta* 1027: 211-217; Dantzigら, 1992, *Biochim.Biophys. Acta* 1112: 167-173]。Caco-2細胞はATCCから受託番号ATCC HTB37の下に入手可能である。

【0030】本発明の例示ベクターを *Escherichia coli* RR1または *E.coli* DH5 α 細胞中に導入し、Northern Regional Research Laboratories (NRRL) (Peoria, Illinois 61604) に1993年1月21日に寄託して永続的な貯蔵培養物コレクションの一部とした。特定の培養物および受託番号を表1に示す。

【表1】

表1

培養物	受託番号
<i>E.coli</i> K12 DH5 α /pPSSJ179	NRRL B-21041
<i>E.coli</i> K12 RR1/pPSSJ189	NRRL B-21042

【0031】培養物を入手し、常法によりプラスミドを単離する。次いで、哺乳類流入ペプチド輸送体を産生させるためにこのプラスミドを直接宿主細胞中に導入することができる。

【0032】プラスミドpPSSJ179は長さが約8500塩基対であり、Caco-2細胞由来の流入ペプチド輸送体をコードしているDNAを含有する。プラスミドpPSSJ179は、流入ペプチド輸送体コード化DNAを含む3.4kb XbaI-HindIII cDNA制限酵素フラグメントを、市販品として入手可能なベクターpRc/RSV (Invitrogen) 中にクローニングすることにより構築した。流入ペプチド輸送体は内部にHindIII制限酵素部位を有しているから、3.4kb XbaI-HindIIIフラグメントのクローニングにおいて部分的な制限酵素消化を用いた。プラスミドpPSSJ179は、*Escherichia coli* における選択のためのアンピシリン耐性遺伝子、真核細胞における選択のためのネオマイシン耐性遺伝子およびラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターから発現するように設置した流入ペプチド輸送体遺伝子を含有する。プラスミドpPSSJ179の制限酵素および機能地図は添付の図1に示す。

【0033】プラスミドpPSSJ189もまた本発明のベクターの例である。プラスミドpPSSJ189は約12.2キロ塩基の大きさである。プラスミドpPSSJ189は、プラスミドpHDの修飾された変異体中にクローン化された流入ペプチド輸送体コード化DNAを含む3.4キロ塩基対の KpnI-SpeI 制限フラグメントを含有する。プラスミドpHDは、流入ペプチド輸送体コード化DNAを含んでいる3.4キロ塩基対の KpnI-SpeI 制限フラグメントのクローニングを容易にするた

めの制限酵素部位を含むよう修飾した。プラスミドpHDは欧州特許公開番号0245949(1987年11月19日公開)中に開示されている。プラスミドpPSSJ189は、*Escherichia coli* における選択のためのアンピシリン耐性遺伝子、真核細胞における選択のためのハイグロマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、および流入ペプチド輸送体遺伝子の発現のために設置したBKエンハンサーおよびアデノウイルス主要後期プロモーターを含有する。プラスミドpPSSJ189の制限酵素および機能地図を添付の図2に示す。

【0034】流入ペプチド輸送体コード化DNAはプラスミドpPSSJ179およびpPSSJ189からさまざまな制限酵素フラグメントとして切り出すことができ、多くの発現ベクター中にクローン化し得ることを当業者は認めるであろう。例えば、流入ペプチド輸送体コード化活性DNAをプラスミドpPSSJ179から3.4キロ塩基対HindIII-XbaI制限酵素フラグメントとして、またはプラスミドpPSSJ189から3.4キロ塩基対の KpnI-SpeI 制限酵素フラグメントとして切り出すことができる。プラスミドDNA内の多数の制限酵素部位の存在のゆえに、完全な流入ペプチド輸送体をコードするDNAフラグメントを調製するために部分的な制限酵素消化が必要であろうことを当業者は認めるであろう。流入ペプチド輸送体コード化活性DNAを含むさまざまな制限酵素フラグメントを同定、単離およびクローニングするための方法は当分野で周知である。

【0035】本明細書の開示に基づき、本発明の流入ペプチド輸送体に構造が類似している他の輸送体を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、DNAハイブリダイゼーションなどの周知の方法またはこれらの方法の組み合わせ

せにより同定することができる。流入ペプチド輸送体は細胞外領域(およそ配列番号1のアミノ酸残基1~778)およびトランスメンブラン領域(およそ配列番号1のアミノ酸残基778~809)からなる。細胞外領域は、カドヘリンとして知られるタンパク質のファミリーに非常に関係がある[Takeichi M., 1990, *Annu. Rev. Biochem.* 59: 237-252]。カドヘリンファミリーは保存性の高い細胞外および細胞内領域を有する。しかし、流入ペプチド輸送体は、カドヘリンの機能的な活性に必要であることが示されている保存性の細胞内領域を有していない[Klinter, 1992, *Cell* 69: 225-236]。カドヘリンと流入ペプチド輸送体との間のこの差異に基づくハイブリダイゼーション法を用いて、流入ペプチド輸送体に関係したタンパク質を同定することができる。

【0036】あるハイブリダイゼーション法の下に、a) カドヘリンファミリーおよび流入ペプチド輸送体の保存性細胞外領域、b) カドヘリンファミリーの保存性細胞内領域に特異的なプローブを得る。PCR法を用いてこのようなプローブを得ることができる。この場合において、鋳型DNAはゲノムDNA、または流入ペプチド輸送体活性およびカドヘリンを発現する異なる組織型のセルラインから得たcDNAであってもよい。鋳型DNAのための可能な供給源には、腎臓、腸管、膵臓由来の細胞または「血液-脳」関門由来の内皮細胞が含まれる。

【0037】カドヘリンファミリーおよび流入ペプチド輸送体の保存性の高い細胞外領域に特異的なプローブを最初にハイブリダイゼーション実験において用いて、カドヘリンおよび他のペプチド輸送体の細胞外領域を有する遺伝子を同定する。次いで、カドヘリンの細胞内領域から得たプローブをハイブリダイゼーションプローブとして用いて、カドヘリンをコードする遺伝子を同定する。細胞外領域に対するプローブと反応するが細胞内領域に対するプローブとは反応しない遺伝子は、流入ペプチド輸送体の候補に相当する。これらの遺伝子を組換えDNA発現ベクター中にクローン化して適当な宿主細胞中に導入する。次いで、形質転換された宿主細胞を流入ペプチド輸送体活性の発現についてアッセイする。

【0038】異種ハイブリダイゼーション法を用いて同じ成果を挙げることができる。この場合には、カドヘリンの細胞外および細胞内部分を表すDNAフラグメントを用いて、可能性のある流入ペプチド輸送体をカドヘリンと区別する。

【0039】本発明の流入ペプチド輸送体をコードしているDNA、またはその任意の部分に基づくプローブを利用する従来のハイブリダイゼーション法を用いてペプチド輸送活性をコードしている他の遺伝子を同定することができる。例えば、配列番号2またはその一部に基づくプローブを用いてペプチド輸送活性を有する遺伝子を同定することができる。また、配列番号1のアミノ酸配列またはその一部に基づく縮重したプローブを用いてペ

プチド輸送活性を有する遺伝子を同定することができる。ハイブリダイゼーション法はManiatisら(1989)が開示している。

【0040】上に示したように、本発明は流入ペプチド輸送体による化合物の取り込みを測定するための方法を提供する。この方法はヒトにおける流入ペプチド輸送体による化合物の経口バイオアベイラビリティの予測において有用である。多種多様の化合物を流入ペプチド輸送体による取り込みについて試験することができる。このような化合物の例には、小さなペプチドおよび治療薬物、例えば抗生物質、ACE阻害物質、およびレニン阻害物質が含まれる。これらの化合物は単なる例示である。この方法は、流入ペプチド輸送体により取り込まれる能力を試験するために事実上いかなる化合物にも適用できる。従って、1つの態様において本発明は、以下の工程からなる、細胞中への化合物の取り込みを測定するための方法を提供する：

- a) 哺乳類流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞と該化合物を接触させ、そして
- b) 該細胞中への該化合物の輸送についてアッセイする。

【0041】本発明の方法において有用な流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターの例は上に記載した。このような組換えDNA発現ベクターは、発現のために選択される宿主細胞における流入ペプチド輸送体活性の最適な発現のために調整することができる。

【0042】上に記載した細胞を含む多種多様の細胞をこの方法において用いることができる。本発明の組換えDNA発現ベクターでの形質転換の前に流入ペプチド輸送体活性を欠く細胞は本法において特に有用である。本発明の組換えDNA発現ベクターでの形質転換の前に測定可能な化合物の取り込みを有する細胞もまた有用である。どちらの場合においても、流入ペプチド輸送体活性をコードしている組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞を、該細胞への試験化合物の輸送の増大についてアッセイすることができる。

【0043】本発明のこの態様において有用な細胞には、例えば*Escherichia coli*および*Bacillus subtilis*などの原核細胞；チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-DHFR⁻ [American Type Culture Collection(ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776から受託番号ATCC CRL-9096の下に入手可能]、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-K1(ATCC CCL-61)、シリアンハムスター細胞A V 1 2(ATCC CRL 1573)、ヒトリンパ球CCRF-CEM細胞、ヒト神経芽腫細胞、ブタ腎臓細胞(LLC-PK₁, ATCC CL101)および肝臓、脳、皮膚および副腎由来の細胞などの真核細胞；*Saccharomyces cerevisiae*および*Pichia pastoris*を含

む酵母細胞; *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC CRL 1711) などのアワヨトウ幼虫細胞を含む昆虫細胞; *Aspergillus* 種を含む菌類細胞が含まれる。また、上に言及した細胞のペプチド輸送欠失突然変異体が本発明の方法において有用であろう。このようなペプチド輸送欠失突然変異体は、*Escherichia coli* [DeFeliceら, 1973, *J. Bacteriol.* 116: 751-7560] および酵母 [Islandら, 1991, *Curr. Genet.* 20: 457-463; Warderら, 1978, *J. Bacteriol.* 136: 1174-1177] について開示されている。

【0044】上に示したように、流入ペプチド輸送体を発現させるために用いる特定のベクターは、利用する宿主細胞に従い異なるであろう。

【0045】流入ペプチド輸送体活性を発現しているトランスフェクタント細胞による化合物の取り込みはさまざまな方法により測定することができる。これらの方法には、宿主細胞内の試験化合物の出現の測定、すなわち該細胞を溶解して溶解物サンプルを高速液体クロマトグラフィーによりまたは該化合物が放射ラベルされている場合には放射活性の検出により化合物を分析することによる測定が含まれる。また、特定の試験化合物に関係する他の特性を測定することができる。即ち、特定の化合物をスクリーニングするために通常用いられるアッセイを利用することができる。例えば、レセプターアッセイにおいてレセプターに対するリガンドの結合を置換(または増強)する化合物の能力、関係のある酵素を阻害(または刺激)する化合物の能力、生物の増殖を阻害(または刺激)する化合物の能力、または試験化合物が有するであろうある種の他の特性を利用することができる。BradnerおよびClaridge [1984, 「抗新生物薬におけるスクリーニング系」, W.A. Remers編, Wiley-Interscience Publ., John WileyおよびSons, Inc. N.Y., NY] により開示されているアッセイを含むさまざまなアッセイを用いて流入ペプチド輸送体活性を測定することができる。

【0046】

【実施例】以下に示す実施例は本発明の一層の理解を助けることを意図している。用いられる特定の物質、種および条件は、本発明をさらに詳しく説明することを意図しており、本発明の正当な範囲を限定しようとするものではない。DNAの操作および分析のための方法は、本質的に Maniatisら (1989) により開示されているように行った。制限酵素反応のための条件は、製造者 [Boehringer Mannheim (BM), Indianapolis, IN; New England Biolabs (NEB), Beverly, MA; Bethesda Research Labs (BRL), Gaithersburg, MD] により推奨されている条件を使用した。

【0047】実施例1

チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1, ATCC CCL 61) を、Stratagene哺乳動物トランスフェクションキット (Stratagene Catalog # 200285) 中に記載されているカルシウム沈殿プロトコルを用いてプラスミドpP

SJ179でトランスフェクションした。プラスミドpPSJ179は、*Escherichia coli* K12 DH5 α /pPSJ179 (NRRL B-21041) から通常のアルカリ-SDS法 (Maniatisら, 1989) を用いて単離することができる。カルシウム沈殿プロトコルのトランスフェクション法を以下のように行った。ほぼ全面成長のCHO-K1細胞 (100mm培養皿、プレーティングの1日後) を、20 μ gのカルシウム-沈殿したDNAサンプルと共に37℃で20分間インキュベートした。DNAサンプルはプラスミドpPSJ179または対照としてのプラスミドpRc/RSVのどちらかであった。続いて、該細胞を10%ウシ胎児血清 (HyClone Laboratories Inc., Logan, UT 84321) を含むF12培地中で3日間増殖させた。この後に、培地を選択薬物、G-418スルフェート (Gibco, Grand Island, NY) を300 μ g/mlで含む増殖培地と置換し、細胞を3%CO₂インキュベーター中、37℃で13日間増殖させた。後の研究のために選択したコロニーを、5%CO₂インキュベーター中、選択した時間、37℃の選択培地において増殖させた。酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) および流入ペプチド輸送体に対して反応性のモノクローナル抗体を用いて、トランスフェクタントを流入ペプチド輸送体の発現について評価した。対照より高いレベルの流入ペプチド輸送体抗原を発現したクローンを輸送研究のために選択した。別法によれば、Dantzigら [1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1027: 211-217] により開示された方法を用いて流入ペプチド輸送体の発現についてクローンを選択する。さらに、配列番号1に基づくプローブを利用するハイブリダイゼーション法を用いて、流入ペプチド輸送体をコードしているDNAを含むクローンを同定することができる。

【0048】実施例2

実施例1で選択したクローンを抗生物質セファレキシンの取り込みについて評価した。セファレキシンはEli Lilly and Company (Indianapolis, IN) から入手可能である。トランスフェクションされたCHO-K1細胞 (ウェル当たり ~ 0.5 から 1×10^5 細胞) を上記のようにCostar 24-ウェルプレート中で3日間増殖させた。全面成長細胞を25mM HEPES, pH 7.4を含むアール平衡塩類溶液 (Gibco, Grand Island, NY) (Trans-EBSS) で洗浄し、37℃で45分間インキュベートし、次いでTrans-EBSSを吸引により除去した。この細胞を120mM塩化コリン、25mM MES, pH 6.0を含むナトリウム不含のアール平衡塩類溶液 (ナトリウム不含, Trans-EBSS) 中、1mM [¹⁴C]セファレキシンの存在下でインキュベートした。続いて、細胞を氷冷Trans-EBSS, pH 7.4で洗浄し、0.2N NaOH中で溶解させ、一部をシンチレーション計数測定のために採取した。

【0049】代表的なトランスフェクタント (クローン

9)は対照より有意に高い ^{14}C セファレキシンの取り込みを示した。後の研究により、このトランスフェクタントによる1mMのセファレキシンの取り込みは、流入ペプチド輸送体による取り込みと競合するジペプチドであるGly-L-Pro(GP)の50mMの存在により阻害されることが示された。細胞を1mM ^{14}C セファレキシンの存在下とGPと共にインキュベートすることにより、

代表的なトランスフェクタント(クローン9)における薬物の取り込みは対照細胞のレベルまで減少した。さらに、対照細胞による1mM ^{14}C セファレキシンの輸送はGly-L-Proジペプチドにより阻害されなかった。これらの研究の結果を表2に示す。

【表2】

表2

サンプル	^{14}C -セファレキシンの取り込み (nmol/mg全細胞タンパク質)
クローン9	6.6 ± 0.3
クローン9+GP	4.5 ± 0.03
対照	3.3 ± 0.6
対照+GP	4.7 ± 0.4

【0050】

【配列表】

【0051】配列番号：1

配列の長さ：832

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

```

Met Ile Leu Gln Ala His Leu His Ser Leu Cys Leu Leu Met Leu
1           5           10           15
Tyr Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Gln Glu Gly Lys Phe Ser Gly Pro
20           25           30
Leu Lys Pro Met Thr Phe Ser Ile Tyr Glu Gly Gln Glu Pro Ser
35           40           45
Gln Ile Ile Phe Gln Phe Lys Ala Asn Pro Pro Ala Val Thr Phe
50           55           60
Glu Leu Thr Gly Glu Thr Asp Asn Ile Phe Val Ile Glu Arg Glu
65           70           75
Gly Leu Leu Tyr Tyr Asn Arg Ala Leu Asp Arg Glu Thr Arg Ser
80           85           90
Thr His Asn Leu Gln Val Ala Ala Leu Asp Ala Asn Gly Ile Ile
95           100          105
Val Glu Gly Pro Val Pro Ile Thr Ile Glu Val Lys Asp Ile Asn
110          115          120
Asp Asn Arg Pro Thr Phe Leu Gln Ser Lys Tyr Glu Gly Ser Val
125          130          135
Arg Gln Asn Ser Arg Pro Gly Lys Pro Phe Leu Tyr Val Asn Ala
140          145          150
Thr Asp Leu Asp Asp Pro Ala Thr Pro Asn Gly Gln Leu Tyr Tyr
155          160          165
Gln Ile Val Ile Gln Leu Pro Met Ile Asn Asn Val Met Tyr Phe
170          175          180
Gln Ile Asn Asn Lys Thr Gly Ala Ile Ser Leu Thr Arg Glu Gly
185          190          195
Ser Gln Glu Leu Asn Pro Ala Lys Asn Pro Ser Tyr Asn Leu Val
200          205          210
Ile Ser Val Lys Asp Met Gly Gly Gln Ser Glu Asn Ser Phe Ser
215          220          225

```


Asp Thr Thr Ser Val Asp Ile Ile Val Thr Glu Asn Ile Trp Lys		
230	235	240
Ala Pro Lys Pro Val Glu Met Val Glu Asn Ser Thr Asp Pro His		
245	250	255
Pro Ile Lys Ile Thr Gln Val Arg Trp Asn Asp Pro Gly Ala Gln		
260	265	270
Tyr Ser Leu Val Asp Lys Glu Lys Leu Pro Arg Phe Pro Phe Ser		
275	280	285
Ile Asp Gln Glu Gly Asp Ile Tyr Val Thr Gln Pro Leu Asp Arg		
290	295	300
Glu Glu Lys Asp Ala Tyr Val Phe Tyr Ala Val Ala Lys Asp Glu		
305	310	315
Tyr Gly Lys Pro Leu Ser Tyr Pro Leu Glu Ile His Val Lys Val		
320	325	330
Lys Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Thr Cys Pro Ser Pro Val Thr		
335	340	345
Val Phe Glu Val Gln Glu Asn Glu Arg Leu Gly Asn Ser Ile Gly		
350	355	360
Thr Leu Thr Ala His Asp Arg Asp Glu Glu Asn Thr Ala Asn Ser		
365	370	375
Phe Leu Asn Tyr Arg Ile Val Glu Gln Thr Pro Lys Leu Pro Met		
380	385	390
Asp Gly Leu Phe Leu Ile Gln Thr Tyr Ala Gly Met Leu Gln Leu		
395	400	405
Ala Lys Gln Ser Leu Lys Lys Gln Asp Thr Pro Gln Tyr Asn Leu		
410	415	420
Thr Ile Glu Val Ser Asp Lys Asp Phe Lys Thr Leu Cys Phe Val		
425	430	435
Gln Ile Asn Val Ile Asp Ile Asn Asp Gln Ile Pro Ile Phe Glu		
440	445	450
Lys Ser Asp Tyr Gly Asn Leu Thr Leu Ala Glu Asp Thr Asn Ile		
455	460	465
Gly Ser Thr Ile Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro		
470	475	480
Phe Thr Gly Ser Ser Lys Ile Leu Tyr His Ile Ile Lys Gly Asp		
485	490	495
Ser Glu Gly Arg Leu Gly Val Asp Thr Asp Pro His Thr Asn Thr		
500	505	510
Gly Tyr Val Ile Ile Lys Lys Pro Leu Asp Phe Glu Thr Ala Ala		
515	520	525
Val Ser Asn Ile Val Phe Lys Ala Glu Asn Pro Glu Pro Leu Val		
530	535	540
Phe Gly Val Lys Tyr Asn Ala Ser Ser Phe Ala Lys Phe Thr Leu		
545	550	555
Ile Val Thr Asp Val Asn Glu Ala Pro Gln Phe Ser Gln His Val		
560	565	570
Phe Gln Ala Lys Val Ser Glu Asp Val Ala Ile Gly Thr Lys Val		
575	580	585
Gly Asn Val Thr Ala Lys Asp Pro Glu Gly Leu Asp Ile Ser Tyr		
590	595	600

Ser Leu Arg Gly Asp Thr Arg Gly Trp Leu Lys Ile Asp His Val
605 610 615
Thr Gly Glu Ile Phe Ser Val Ala Pro Leu Asp Arg Glu Ala Gly
620 625 630
Ser Pro Tyr Arg Val Gln Val Val Ala Thr Glu Val Gly Gly Ser
635 640 645
Ser Leu Ser Ser Val Ser Glu Phe His Leu Ile Leu Met Asp Val
650 655 660
Asn Asp Asn Pro Pro Arg Leu Ala Lys Asp Tyr Thr Gly Leu Phe
665 670 675
Phe Cys His Pro Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Ile Phe Glu Ala
680 685 690
Thr Asp Asp Asp Gln His Leu Phe Arg Gly Pro His Phe Thr Phe
695 700 705
Ser Leu Gly Ser Gly Ser Leu Gln Asn Asp Trp Glu Val Ser Lys
710 715 720
Ile Asn Gly Thr His Ala Arg Leu Ser Thr Arg His Thr Asp Phe
725 730 735
Glu Glu Arg Ala Tyr Val Val Leu Ile Arg Ile Asn Asp Gly Gly
740 745 750
Arg Pro Pro Leu Glu Gly Ile Val Ser Leu Pro Val Thr Phe Cys
755 760 765
Ser Cys Val Glu Gly Ser Cys Phe Arg Pro Ala Gly His Gln Thr
770 775 780
Gly Ile Pro Thr Val Gly Met Ala Val Gly Ile Leu Leu Thr Thr
785 790 795
Leu Leu Val Ile Gly Ile Ile Leu Ala Val Val Phe Ile Arg Ile
800 805 810
Lys Lys Asp Lys Gly Lys Asp Asn Val Glu Ser Ala Gln Ala Ser
815 820 825
Glu Val Lys Pro Leu Arg Ser
830 832

【0052】配列番号：2

配列の長さ：2499

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列：

ATGATACTTC AGGCCCATCT TCACTCCCTG TGTCTTCTTA TGCITTTATT 50
GGCAACTCGA TATGGCCAAG AGGGGAAGTT TAGTGGACCC CTGAAACCCA 100
TGACATTTTC TATTTATGAA GGCCAAGAAC CGAGTCAAAT TATATTCAG 150
TTTAAGGCCA ATCTCTCTGC TGTGACTTTT GAACTAACTG GGGAGACAGA 200
CAACATATTT GTGATAGAAC GGGAGGGACT TCTGTATTAC AACAGAGCCT 250
TGGACAGGGA AACAAGATCT ACTCACAATC TCCAGTTGC AGCCCTGGAC 300
GCTAATGGAA TTATAGTGGG GGTCCAGTC CTTATCACC A TAGAAGTGAA 350
GGACATCAAC GACAATCGAC CCACGTTTCT CCAGTCAAAG TACGAAGGCT 400
CAGTAAGGCA GAACTCTGCC CCAGGAAAGC CCTTCTTGTA TGTCAATGCC 450
ACAGACCTGG ATGATCCGGC CACTCCCAAT GGCCAGCTTT ATTACCAGAT 500
TGTATCCAG CTTCCCATGA TCAACAATGT CATGTACTTT CAGATCAACA 550
ACAAAACGGG AGCCATCTCT CTTACCCGAG AGGGATCTCA GGAATTGAAT 600
CCTGCTAAGA ATCTCTCTTA TAATCTGGTG ATCTCAGTGA AGGACATGGG 650
AGGCCAGAGT GAGAATTCTT TCAGTGATAC CACATCTGTG GATATCATAG 700

TGACAGAGAA TATTTGAAA GCACCAAAAC CTGTGGAGAT GGTGAAAAC	750
TCAACTGATC CTCACCCCAT CAAAATCACT CAGGTGCGGT GGAATGATCC	800
CGGTGCACAA TATTCCTTAG TTGACAAAGA GAAGCTGCCA AGATTCCCAT	850
TTTCAATTGA CCAGGAAGGA GATATTIACG TCACTCAGCC CTTGGACCGA	900
GAAGAAAAGG ATGCATATGT TTTTATGCA GTTGCAAAGG ATGAGTACGG	950
AAAACCACTT TCATATCCGC TGGAAATCA TGTAAAAGTT AAAGATATTA	1000
ATGATAATCC ACCTACATGT CCGTCACCAG TAACCGTATT TGAGGTCCAG	1050
GACAATGAAC GACTGCGTAA CAGTATCGGG ACCCTTACTG CACATGACAG	1100
GGATGAAGAA AATACTGCCA ACAGTTTTCT AAACACAGG ATTGTGAGC	1150
AAACTCCCAA ACTTCCCATG GATGGACTCT TCCTAATCCA AACCTATGCT	1200
CGAATGTTAC AGTTAGCTAA ACAGTCCTTG AAGAAGCAAG ATACTCCTCA	1250
GTACAACTTA ACGATAGAGG TGTCTGACAA AGATTTCAAG ACCCTTTGTT	1300
TTGTGCAAAAT CAACGTTATT GATATCAATG ATCAGATCCC CATCTTGAA	1350
AAATCAGATT ATGGAAACCT GACTCTTCTT GAAGACACAA ACATTGGGTC	1400
CACCATCTTA ACCATCCAGG CCACTGATGC TGATGAGCCA TTTACTGGGA	1450
GTCTAAAAAT TCTGTATCAT ATCATAAAGG GAGACAGTGA GGGACGCTG	1500
GGGGTTGACA CAGATCCCA TACCAACACC GGATATGTCA TAATTAAAAA	1550
GCCTCTTGAAT TTGAAACAG CAGCTGTTTC CAACATTGTG TTEAAAGCAG	1600
AAAATCCTGA GCCTCTAGTG TTTGGTGTGA AGTACAATGC AAGTTCTTTT	1650
GCCAAGTTCA CGCTTATTGT GACAGATGTG AATGAAGCAC CTCATTTTTC	1700
CCAACACGTA TTCCAAGCGA AAGTCAGTGA GGATGTAGCT ATAGGCACTA	1750
AAGTGGGCAA TGTGACTGCC AAGGATCCAG AAGCTCTGGA CATAAGCTAT	1800
TCACTGAGCG GAGACACAAG AGTTGGCTT AAAATTGACC ACGTGACTCG	1850
TGAGATCTTT AGTGTGGCTC CATTTGGACAG AGAAGCCGGA AGTCCATATC	1900
GGGTACAAGT GGTGGGCACA GAAGTAGGGG GGTCTTCTT AAGCTCTGTG	1950
TCAGAGTTCC ACCTGATCCT TATGATGTG AATGACAACC CTCCAGGCT	2000
AGCCAAGGAC TACACGGGCT TGTCTTCTG CCATCCCTTC AGTGCACCTG	2050
GAAGTCTCAT TTTGAGGCT ACTGATGATG ATCAGCACTT ATTTGGGGT	2100
CCCATTTTAA CATTTTCCCT CGGCAGTGA AGCTTACAAA ACGACTGGGA	2150
AGTTTCCAAA ATCAATGGTA CTCATGCCCG ACTGTCTACC AGGCACACAG	2200
ACTTTGAGGA GAGGGCTAT GTCGTCTGA TCCGCATCAA TGATGGGGT	2250
CGGCCACCTT TGAAGGCAT TGTTCCTTA CCAGTTACAT TCTGCAGTTG	2300
TGTGGAAGGA AGTTGTTTCC GGCCAGCAGG TCACCAGACT GGGATACCA	2350
CTGTGGGCAT GGCAGTTGGT ATACTGCTGA CCACCTTCT GGTGATTGGT	2400
ATAATTTTAA CAGTTGTGTT TATCCGCATA AAGAAGGATA AAGGCAAAGA	2450
TAATGTTGAA ACTGCTCAAG CATCTGAAGT CAAACCTCTG AGAAGCTGA	2499

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpPSJ179の制限酵素部位および機能地図の模式図である。

【図2】 プラスミドpPSJ189の制限酵素部位および機能地図の模式図である。

【図1】

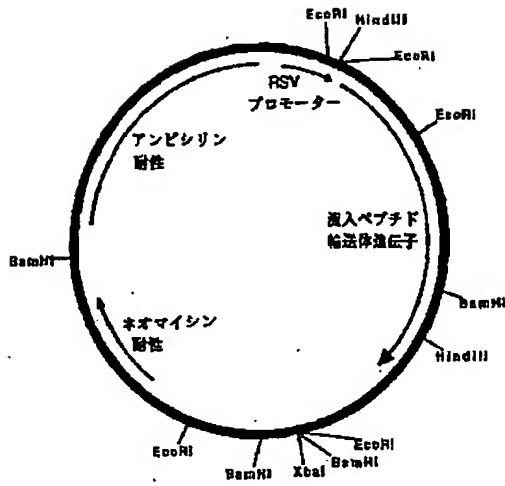


FIG. 1

プラスミド pPSJ179

【図2】

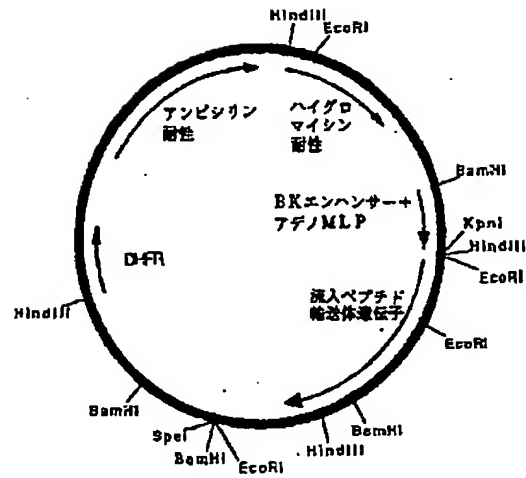


FIG. 2

プラスミド pPSJ189

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 1 2 Q 1/02

// (C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

6807-4 B

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 ジョアン・ホスキンス

アメリカ合衆国46256インディアナ州イン
ディアナポリス、ターン・コート8229番

(72) 発明者 ポール・ルーサー・スカットラッド

アメリカ合衆国46143インディアナ州グリー
ンウッド、レイク・クロッシング2412番

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.